

Tr. har.
7.12

Identificação e enumeração rápidas de Escheri
chia coli e Salmonella typhimurium no ovo de
galinha através da técnica da membrana fil
trante.

05/84

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola

Identificação e enumeração rápidas de
Escherichia coli e Salmonella typhimurium
no ovo de galinha através da
técnica da membrana filtrante

Clarice Queico Fujimura Leite
farmacêutica-bioquímica

Orientador:

Prof. Dr. Fumio Yokoya

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Clarice Queico Fujimura Leite e aprovada pela comissão julgadora em 8/06/84. Campinas, 8 de fevereiro de 1984.

Aos queridos:

Morisada e Himiko
meus pais

Sergio
meu marido

Mônica
minha filha

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Microbiologia da UNICAMP/FEAA, UFSCar/DCB e UNESP/FCF e laboratório de Bioquímica da UNESP/IQ, com o auxílio financeiro concedido pela FAPESP, processo nº 80/1833-0 e pelo CNPq, processo nº 101737-82.

AGRADECIMENTOS

- . pela acolhida, orientação e dinamismo, ao Prof.Dr. Fumio Yokoya;
- . pelo incentivo, dedicação e cessão do laboratório de microbiologia da Universidade Federal de São Carlos/UFSCar, ao Prof.Dr. Pedro Magalhães Lacava;
- . pela colaboração prestada, ao Prof. Dr. Antonio Longo, Diretor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP;
- . pelo interesse e colaboração prestado, ao Prof. Dr. Demerval C. Lima, do Instituto de Química da UNESP;
- . pelo fornecimento de diversas enzimas, à Novo Industri do Brasil;
- . pela gentileza das cópias deste trabalho, à Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos/ABIA;
- . pelas atenciosas sugestões e correções, à Profª. Dra. Deise P. Falcão, da Faculdade de Ciências Farmecêuticas da UNESP;
- . pelas criteriosas e oportunas observações, aos Profs.Drs.: Clara P. Mendonça, Sonia Salzberg, Pilar de Massaguer, Antonio M. Serrano e Vanderley P. Canhoz;
- . pela revisão bibliográfica, à Bibliotecária Maria Estela Moraes Caramori, da Biblioteca da UNESP, Campus de Araraquara;
- . pela datilografia deste trabalho, à Mariza Campos M. Maximo;
- . pela contribuição direta ou indireta, a todos aqueles que me permitiram, com amizade e compreensão, a oportunidade de aprender.

S U M Á R I O

INTRODUÇÃO	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
I - Ovo de galinha: implicações microbiológicas e proble <u>ma</u> s com a ultrafiltração	05
II - Salmonella e E. coli: técnicas de isolamento e proble <u>ma</u> s inerentes às metodologias utilizadas	06
III - Membrana filtrante	09
MATERIAL	13
I - Equipamentos	14
II - Reagentes	14
III - Meios de Cultura	15
IV - Material Analisado	16
V - Bactérias Empregadas	16
MÉTODOS	17
I - Estudo da filtrabilidade da clara, da gema e do ovo lí <u>q</u> uido, de galinha	18
1. Tratamento do Ovo Líquido	18
1.1. Com adsorvente	18
1.2. Com agente surfactante: Tween 80	18
1.3. Com agente precipitante: acetato de chumbo ...	19

1.4. Associação dos tratamentos citados em 1.1, 1.2 e 1.3	19
1.5. Utilização de filtros não convencionais	19
1.6. Utilização de polietilenoglicol (PEG) como flocculante	20
1.7. Acidificação do ovo líquido com ácido clorídrico	20
2. Tratamento da clara de ovo	20
2.1. Acidificação da clara com ácido clorídrico ...	20
2.2. Utilização de polietilenoglicol (PEG) como agente flocculante	21
2.3. Utilização de proteases para a digestão da albumina da clara	21
2.3.1. Ação proteolítica no revestimento do filme fotográfico	21
2.3.2. Escolha da enzima mais apropriada para as proteínas da clara	22
2.3.3. Estudo da cinética enzimática tendo a clara como substrato	24
3. Tratamento da Gema de Ovo	25
3.1. Acidificação da gema com ácido clorídrico	25
3.2. Utilização do PEG como agente flocculante	25
3.3. Utilização de proteases para a digestão das proteínas da gema	26
3.3.1. Escolha da enzima mais apropriada para as proteínas da gema	26
3.3.2. Estudo da cinética enzimática	26
3.3.3. Utilização de lipases para a degradação de triglicerídios da gema	26
4. Verificação dos volumes máximos de clara, de gema e	

de ovo líquido, tratados enzimaticamente, filtrá veis através da membrana HAWG 47 mm	27
II - Ação das enzimas sobre a viabilidade de uma entero bactéria	28
III - Recuperação da enterobactéria E. coli através de di versos métodos de filtração	29
IV - Ensaaios sobre a recuperação da E.coli e da S.typhimu rium	30
RESULTADOS	33
I - Emprego de protease para a digestão de proteínas da clara e da gema	34
II - Utilização de lipases para a degradação de triglice rídios da gema	36
III - Verificação dos volumes máximos de clara, gema e de ovo líquido, tratados enzimaticamente, filtráveis a través da membrana HAWG 47 mm	37
IV - Ação das enzimas sobre a viabilidade da E. coli	37
V - Recuperação da E. coli através dos diversos métodos de filtração	38
VI - Ensaaios para a verificação da recuperação da E. coli da clara e do ovo líquido, pelos métodos clássicos e por aquele por nós desenvolvido	39
VII - Ensaaios para a verificação da recuperação da S.tiphi murium da clara e do ovo líquido, contaminados arti	

ficialmente, pelo método clássico e pelo método da mem <u>br</u>	
brana filtrante	41
TABELAS	42
GRÁFICOS	57
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
RESUMO	88
ABSTRACT	90
APÊNDICE	92

INTRODUÇÃO

O controle microbiológico de alimentos tem, como objetivo principal, fornecer um produto em condições higiênico-sanitárias adequadas, livre de contaminantes capazes de causar riscos à saúde do consumidor. No caso de um surto de gastrenterite, a necessidade de correlacionar o microrganismo presente em um alimento com o agente etiológico da doença tem como finalidade orientar a conduta dos órgãos competentes.

As bactérias do gênero *Salmonella* e *E. coli* são os microrganismos mais pesquisados em alimentos; o primeiro pela sua importância médica como patógeno e o segundo por ser indicador de contaminação fecal^{5, 50, 90, 16}. Porém, as dificuldades e a demora inerentes aos métodos utilizados na análise microbiana, se constituem em fatores limitantes no controle microbiológico de alimentos processados⁶⁵ e no diagnóstico correto dos patógenos responsáveis por gastrenterites²².

Este trabalho teve como finalidade desenvolver uma metodologia rápida e prática para enumerar *E. coli* e *S. typhimurium* presentes em alimentos, os quais após tratamento prévio a dequado eram filtrados em membranas capazes de reter os microrganismos, que a seguir eram colocadas em meios de cultura apropriados e incubadas. O material escolhido para o trabalho foi o ovo de galinha (clara, gema e ovo líquido), por se tratar de um alimento rico em nutrientes, altamente perecível e que pela sua natureza química (alto teor de proteínas e de lipídios) é de difícil filtração^{34, 74, 89}. Diferentes métodos foram por nós estudados, no sentido de reduzir a viscosidade do material, tais como: emprego de terra diatomácea, Tween 80 e diversas proteases e lipases. A diminuição de viscosidade facilita a filtração, possibilitando que um dado volume de alimento atravessasse com maior facilidade uma membrana bacteriológica com poros de 0,45 µm. Ao lado de estudos efetuados para diminuição da viscosidade, foi investi

gada comparativamente a eficácia da membrana filtrante e dos mé
todos clássicos de cultura, na recuperação de *E. coli* e *S. typhi*
murium, na clara, gema e no ovo líquido, artificialmente contami
nados.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os microrganismos patogênicos frequentemente encontrados nos alimentos, em número variável, podem tornar-se responsáveis por casos de toxi-infecções de origem alimentar, provocando desde um ligeiro mal estar, dor de cabeça, náuseas, vômitos e diarreia, até morte, de acordo com o patógeno presente⁵⁰.

I - Ovo de galinha: implicações microbiológicas e problemas com a ultrafiltração.

Entre os alimentos, o ovo de galinha, devido à abundância de nutrientes propícios ao desenvolvimento de microrganismos⁵¹, é considerado um dos veículos mais importantes de disseminação de salmonelas¹⁴. Estas podem ser isoladas do ovário, oviduto e da cavidade peritoneal das aves infectadas e de ovos ainda antes da postura³⁵. As salmonelas também têm a capacidade de penetrar no interior do ovo através da casca contaminada³⁶. Devido a esses fatores, a pasteurização do ovo líquido, da clara ou da gema, é feita principalmente com o objetivo de eliminar as salmonelas. Infelizmente o tempo e a temperatura usados para eliminá-las estão próximos ou mesmo dentro da faixa adversa que produz alterações físicas e funcionais nas proteínas do ovo. A albumina da clara é particularmente muito sensível, desnaturando-se em poucos minutos à temperatura de 60°C⁶⁴.

A *Salmonella* é também o contaminante principal do ovo desidratado; o problema se torna mais sério se houver desenvolvimento do microrganismo durante o processo de fermentação para remoção de glicose⁵¹.

Do ponto de vista físico, a clara de ovo se constitui num produto de difícil filtração, devido à sua concentração de cerca de 10 a 11% de proteínas com peso molecular entre

34.000 e 45.600^{34, 77, 88}, cujas moléculas esféricas alcançam diâmetro de até 0,42 µm e conferem ao material uma alta viscosidade⁸⁹.

A gema do ovo, por sua vez, constituída de 33% de lipídios e 16% de proteínas^{34, 51, 77, 82, 89}, passíveis de observação ao microscópio, como esferas cujos diâmetros variam de 25 a 150 µm⁸⁹, também é um material de difícil filtração em membranas com poros de 0,45 µm de diâmetro.

II - Salmonella e E. coli: técnicas de isolamento e problemas inerentes às metodologias utilizadas.

Um dos microrganismos mais pesquisados pela sua importância médica é a Salmonella, responsável por inúmeros surtos de gastroenterite^{58, 66, 106, 107, 108}. A questão é de tal importância que a Comissão Nacional de Normas e Padrões do Ministério da Saúde¹⁶ e a Secretaria de Saúde do Governo de São Paulo, através do decreto nº 12486, de 20 de outubro de 1978⁹⁰, determinaram que, nos alimentos processados ou industrializados, a Salmonella deve estar ausente em 25 g de amostra. Porém, o isolamento desse microrganismo constitui um problema técnico complexo, principalmente quando os germes se apresentam em número reduzido no material. Com o fim de contornar tal dificuldade, o microbiologista lança mão de um pré-enriquecimento^{19, 21, 25, 37, 38, 63, 87} e de um enriquecimento seletivo^{37, 38, 63} para a recuperação de Salmonella, antes de prosseguir dentro do esquema geral de isolamento de enterobactérias, com plaqueamento em meios seletivos e diferenciais^{8, 21, 30, 31}, caracterização bioquímica⁵⁰ e análise antigênica². Para atender à legislação vigente¹⁶ é pois necessário realizar o pré-enriquecimento de 25g do alimento durante 24 horas, o enriquecimento por igual período de tempo e, em seguida,

fazer a semeadura em meios seletivo-diferenciadores, com incubação pelo tempo preconizado. Assim, pelo método tradicional, a obtenção de um resultado presuntivo da presença de *Salmonella*, requer pelo menos 3 dias, além do que a técnica torna o processo dispendioso. Com a finalidade de contornar esses problemas, vários trabalhos têm sido realizados no sentido de reduzir o tempo da análise ou desenvolver metodologias mais eficazes, como imunofluorescência⁹⁷, ensaios imunoenzimáticos^{59,100}, radiometria¹⁰⁰ e hibridação DNA-DNA⁷². Informações com relação ao emprego das técnicas de radiometria, ensaio imunoenzimático e hibridação DNA-DNA, são em número reduzido. No que tange à técnica de imunofluorescência, diversos trabalhos citam a ocorrência de resultados falso-positivo, em 4 a 17% dos ensaios^{49, 76, 104}.

Além da importância em verificar a presença ou ausência de *Salmonella* em 25 g de alimento, a necessidade de enumerá-la começou a preocupar os microbiologistas, pois, a quantidade de microrganismos necessária para promover a infecção é diferente⁶⁷, de acordo com a espécie e o sorotipo. Assim, têm surgido trabalhos no sentido de enumerar as salmonelas utilizando o método de plaqueamento em superfície empregando ágar seletivo ou o método do número mais provável (NMP) em meio de enriquecimento^{24, 46, 47, 65}. Quando o alimento contém outros contaminantes capazes de crescer em meio seletivo sólido, a pesquisa de *Salmonella* pode ficar prejudicada⁷⁴. Como a quantidade de inóculo utilizado é pequena (da ordem de 0,01 g), o método se torna impraticável em alimentos que contêm concentração abaixo de 100 microrganismos por grama. Para a técnica do NMP, pode também ser citada uma série de inconvenientes, que são os mesmos relacionados aos coliformes^{94, 97, 109}.

Devido às dificuldades na determinação de patógenos, costuma-se pesquisar grupos de microrganismos conhecidos co

mo indicadores; entre estes estão os indicadores de contaminação fecal. Muitos são os trabalhos que discutem a importância da utilização de coliformes totais e da *E. coli* como indicadores de contaminação fecal^{3, 5, 18, 39}; no entanto, é consenso que um grande número de coliformes sugere uma falta de limpeza, manuseio e estocagem impróprios dos alimentos⁷⁵ e a eventual presença de microrganismos patogênicos⁵⁰.

Para a enumeração desses contaminantes fecais, utiliza-se a técnica do NMP, que é descrita e aceita pelas comissões internacionais pertinentes^{1, 4, 5, 50}. Para sua determinação são preconizadas 3 variações do método. A primeira consiste na utilização do caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) acompanhado de confirmação em caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (BGLB); a segunda, somente na utilização do caldo Mac Conkey (MaC) e a terceira, na utilização do caldo BGLB e confirmação em ágar Endo¹⁰³. Desde que a contagem de coliformes pode incluir variedades diferentes de bactérias, dependendo dos meios de cultura, da espécie de microrganismo, do tempo de incubação e do critério empregado para a leitura dos resultados, há a possibilidade de laboratórios diversos obterem resultados diferentes. Porém, no estudo realizado por Silliker et alii⁹⁷, em associação com 15 laboratórios, foi demonstrado que as diferenças resultantes da utilização das três variações de método, eram relativamente pequenas quando comparadas com a diferença de porcentagem de recuperação utilizando os mesmos meios.

A positividade de resultado dessas três variações do método de NMP consiste, basicamente, na fermentação de lactose e produção de gás em 48 horas de incubação a 35-37° C. A confirmação da presença de coliformes totais necessita, portanto, de um tempo mínimo de 72 horas. Porém, a ausência de gás após 48 horas de incubação (teste negativo), exclui alguns coliformes que

fermentam a lactose com lentidão¹⁰⁹ e até mesmo algumas cepas de *E. coli* enteropatogênicas não fermentadoras de lactose⁷⁰.

Outras desvantagens da técnica do NMP podem ser citadas, como por exemplo a obtenção de um resultado falso positivo pela introdução de alimentos ricos em sacarose no meio de cultura e, conseqüentemente, produção de gás por bactérias não fermentadoras de lactose, ou ainda, resultados falso-negativos pela presença de inibidores naturais ou artificiais nos alimentos, que irão afetar o crescimento dos microrganismos mesmo quando cultivados em meios apropriados⁹⁴.

Ainda mais, sendo esse método um teste de número mais provável, ou seja, uma estimativa baseada em fórmulas de probabilidade, a exatidão está na dependência do número de tubos usados¹⁰⁹. Swarop, citado por Yokoya¹⁰⁹, em 1940 já havia demonstrado que a análise de um só tubo fornece um erro de 130% e à medida em que o número de tubos aumenta de 5 para 20 e para 200, os erros caem de 60 para 30 e finalmente para 10%.

III - Membrana filtrante

A técnica da membrana filtrante é um método relativamente novo que concentra, remove e enumera bactérias em líquidos e no ar. A terminologia usada quando se está referindo a este dispositivo varia muito, sendo conhecido como Membrana Filtrante Molecular, Membrana Filtrante ou ainda, Filtro Molecular¹⁰.

Originalmente a técnica foi desenvolvida como método para testar a qualidade sanitária da água na Alemanha durante e após a 2ª Grande Guerra. O primeiro estudo nos Estados Unidos foi feito por Goetz em 1947⁴². Posteriormente, Goetz e seu

grupo desenvolveram, no Instituto de Tecnologia da Califórnia, métodos de manufatura de membranas e meios que favorecessem o crescimento das bactérias coletadas sobre o filtro¹⁰.

A membrana é um disco fino de acetato de celulose com poros minúsculos de 0,45 μ m de diâmetro, e tem a função de reter as bactérias presentes nos líquidos que atravessam seus poros, mediante uso de pressão ou sucção. Após a recuperação dos microrganismos, a membrana é coletada assepticamente e colocada sobre uma placa absorvente contendo um meio nutritivo e diferencial, geralmente de concentração dupla, que é incubada em temperatura adequada ao desenvolvimento do organismo desejado⁷¹. Os nutrientes fluem através dos poros da membrana, alimentando as bactérias e permitindo, assim, sua reprodução e formação de colônias, que geralmente após 15 a 18 horas de incubação já podem ser observadas a olho nu⁴⁴. O método, portanto, é de execução fácil, fornecendo resultados presuntivos em menos de 24 horas e com utilização mínima de meios de cultura e vidraria⁷¹. A estas vantagens podem ser acrescidas ainda: a eliminação de componentes interferentes, como açúcares ou inibidores presentes nos alimentos e a consequente ocorrência de resultados falso positivos ou negativos⁹⁴; enumeração dos microrganismos pela contagem direta das colônias formadas⁵ e transferência sucessiva da membrana de um meio para o outro, conforme o interesse⁵².

O método é aceito atualmente para a detecção de coliformes em água⁵ e inúmeros trabalhos têm sido realizados no sentido de otimizar a técnica, modificando os meios de cultura, procedimentos e temperaturas^{41, 43, 48, 60, 61, 81, 88, 91, 28}.

Ainda outros organismos presentes naturalmente ou introduzidos artificialmente na água têm sido recuperados pela utilização da membrana filtrante, como por exemplo a *Yersinia enterocolitica*¹¹, *Staphylococcus aureus*⁵⁴, *Streptococcus faecalis*⁶, *Serratia marcescens*

cens^{82, 92}, *Proteus vulgaris*^{82, 92} e *Salmonella thyphimurium*^{82, 92}.

Muitos trabalhos vêm sendo realizados no sentido de usar a membrana na análise microbiológica de alimentos, tanto líquidos como sólidos e pastosos^{10, 23, 45, 83, 84, 93}. Assim, estudos foram realizados para a recuperação de coliformes e *E. coli*^{20, 26, 32, 40, 86, 93, 94, 95}, *Salmonella*^{20, 27, 53, 84}, *Bacillus*^{10, 17}, *Staphylococcus aureus*⁸⁴, *Streptococcus faecalis*⁸⁴, fungos^{44, 45} e vírus^{55, 56, 57, 101, 105}.

Os produtos alimentícios apresentam vários componentes que dificultam a filtração, tais como partículas em suspensão, proteínas no estado coloidal, gorduras, etc. Assim, inúmeros trabalhos têm sido realizados visando uma técnica capaz de aumentar a filtrabilidade dos alimentos, como por exemplo a utilização de um novo modelo de homogeneizador de alimentos denominado de "Stomacher", que remove as bactérias do material através de vigorosos golpes e compressão, promovendo atrito entre as partículas, em lugar de afetar a estrutura física do alimento, como ocorre na trituração^{93, 94}. Outros métodos físicos para aumentar a filtrabilidade incluem o uso de filtros de papel, telas de "nylon", lã de vidro, gaze, etc.^{55, 56, 94, 101, 105} e de membranas de diferentes procedências^{86, 94}. Como métodos químicos, têm sido empregados agentes floculantes, como polieletrólitos^{56, 57, 58}; agentes surfactantes, como Triton X e Tween 80^{20, 53, 84, 93}; proteases^{20, 53, 84, 85, 94, 105} e soluções de ácidos ou bases^{101, 105} com a finalidade de precipitar as proteínas.

Com referência especial às proteínas de ovo, Kirkan e Hartman⁵³, trabalhando com albumina de ovo desidratado, sugeriram a utilização de proteases fúngicas, dentre outros métodos alternativos. Por outro lado, Becher e Hartell¹² verificaram um efeito sinérgico de certas enzimas proteolíticas, quando associa

das com lisozima, na destruição de bactérias.

Assim, a introdução de uma protease na clara de ovo para a hidrólise protéica, poderia influir negativamente na recuperação de bactérias viáveis, visto ser ela uma fonte natural de lisozima .

MATERIAL

Para o desenvolvimento do presente trabalho foi empregado o seguinte material:

I - EQUIPAMENTOS

- . Fluxo laminar horizontal Veco Indústria Brasileira
Campinas/SP
- . Agitador Vortex Ciclo Mixer - Repres. Cap. Casa da Química
Soc. Ltda.
- . pH metro Corning Digital 110
- . Banho-maria - Soc. Fabbe Ltda. modelo 169
- . Contador de Colônias da Biomatic Aparelhos Científicos Ltda
- . Colorímetro Fotoelétrico da Micronal B 240
- . Microscópio Óptico binocular Nikkōn 47 372
- . Microscópio Estereoscópio Nikkon
- . Bomba de vácuo e pressão Millipore Corporation XX 6000000
- . Suporte de vidro Millipore Corporation XX 1004724
- . Membrana Millipore Corporation HAWG 04700 47mm com poros de
0,45 μm
- . Placas absorventes Millipore Corporation EP 1004700
- . Balanças, autoclaves, estufas e vidrarias.

II - REAGENTES

- . Ácido clorídrico PA Merck
- . Alumina PA Reagen
- . Acetato de chumbo PA Reagen

- . Celite PA Reagen
- . Hidróxido de Sódio PA Merck
- . Polietilenoglicol Carbowax 4000 da Henrifarma
- . Reativo para fenol Folin Ciocauteau QEEL
- . Reativo para teste de urease (*)
- . Tween 80 QEEL
- . L-tirosina Merck
- . Soro Anti-salmonela Polivalente Flagelar do Instituto Adolfo Lutz
- . Soro Anti-salmonela Polivalente Somático do Instituto Adolfo Lutz
- . Alcalase, protease bacteriana da Novo Industri 0,676 unidade Anson/g
- . Bromelina Sigma 1:3000
- . Bromelina Wako Pure Chemical Industrie Ltda 1:3000
- . Lipase de germe de trigo Sigma
- . Neutrase, protease fúngica da Novo Industri
- . Papaína Biobrás 465 WPA (mc)/G
- . Pancreatina Merck
- . Pepsina Wako Pure Chemical Industries Ltda 1:10000
- . Pepsina Merck 1:10000

III - MEIOS DE CULTURA

Todos os meios de cultura foram da marca Difco, com exceção daqueles preparados no laboratório.

- . Ágar m Endo les
- . Ágar Endo
- . Ágar Nutriente
- . Ágar Salmonela Shigella (SS)
- . Ágar Verde Brilhante
- . Caldo Bile Verde Brilhante
- . Caldo Lauril Sulfato Triptose
- . Caldo Lactosado (LB)
- . Caldo m Tetracionato base (*)
- . Caldo Tetracionato base
- . Caldo m Verde Brilhante (*)
- . Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI)

(*) Meios de cultura e reagentes preparados em nosso laboratório

IV - MATERIAL ANALISADO

- . Como material de pesquisa empregou-se a clara, a gema e ovo de galinha integral, no estado natural, sem casca e ho mogeneizado, denominado ovo líquido.

V - BACTÉRIAS EMPREGADAS

- . Escherichia coli, com características morfológicas e fisioló gicas da espécie, fornecida pelo laboratório de Microbiolo gia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.
- . Salmonella typhimurium, com características morfológicas e fisiológicas da espécie, fornecida pelo mesmo laboratório.

MÉTODOS

I - Estudo da filtrabilidade da clara, da gema e do ovo líquido, de galinha.

Em testes preliminares de filtragem, verificamos que volumes pequenos, tais como 0,01 ml de ovo líquido, 0,01 ml de gema ou 0,02 ml de clara, eram suficientes para ocluir os poros de 0,45 μ m de diâmetro das membranas HAWG 47 mm, antes do término da filtração. Desta forma, foram realizados experimentos com o objetivo de aumentar a filtrabilidade do alimento, sem alterar o número de microrganismos viáveis presentes. Estes estudos visaram principalmente a alteração das estruturas protéicas e lipídicas, componentes predominantes do ovo.

1. TRATAMENTO DO OVO LÍQUIDO

1.1. Com adsorventes

Para a experiência foram empregados dois adsorventes, alumina e terra diatomácea. O ovo líquido foi diluído de 100 vezes com água destilada e porções de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ml foram transferidas para tubos de ensaio. Em cada tubo foi adicionado 1,0 g de um dos adsorventes e água destilada suficiente para completar 50,0 ml, sob agitação. Após 10 min de repouso, o material foi filtrado, primeiro em papel de filtro comum, para eliminar o excesso de adsorvente e componentes adsorvidos e, depois, em membrana HAWG 47mm, sob vácuo de 300 mm de Hg.

1.2. Com agente surfactante: Tween 80

Porções de 4,0; 5,0 e 6,0 ml de ovo líquido, diluído como anteriormente descrito, foram transferidas para tubos de ensaio e acrescidas de 5,0 ml de Tween 80 a 5%. O volume das a

mostras foi completado até 50,0 ml com água destilada. As amostras foram homogeneizadas, deixadas em repouso por 10 minutos e em seguida filtradas, através de membranas filtrantes e sob vácuo.

1.3. Com agente precipitante: acetato de chumbo

Volumes de 1,0; 2,0 e 3,0 ml de solução de ovo líquido diluído com água destilada, foram transferidos para tubos de ensaio e cada um acrescido de 1,0 g de acetato de chumbo e de água destilada para completar 50,0 ml. Após homogeneização e repouso por 10 min as amostras foram submetidas a filtração em papel de filtro comum em membrana filtrante, sob vácuo.

1.4. Associação dos tratamentos citados em 1.1, 1.2 e 1.3

Porções de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 ml de ovo líquido, diluídas de 10 vezes com água destilada, foram transferidas para tubos de ensaio e acrescidas de uma das seguintes associações: 1,0 g de um dos adsorventes com 5,0 ml de Tween 80 a 5%; 1,0 g de um dos adsorventes com 1,0 g de acetato de chumbo e 5,0 ml de Tween 80 a 5% com 1,0 g de acetato de chumbo. O volume das amostras de cada tubo foi elevado para 50,0 ml com água destilada, sob agitação; após repouso de 10 min foram filtradas, primeiro em papel de filtro comum e depois em membrana filtrante, sob vácuo.

1.5. Utilização de filtros não convencionais

A solução de ovo líquido preparada como no item 1.1, foi submetida a uma filtração prévia nos seguintes materiais: gaze farmacêutica, fibra de vidro prensada e papel de filtro qualitativo, antes do uso da membrana filtrante.

1.6. Utilização de polietilenoglicol (PEG) como flocculante

Volumes de 10,0 ml de ovo líquido diluídos como no item 1.3, foram transferidos para tubos de ensaio e acrescidos de 1,0 ml de PEG a 20%. Após homogeneização e repouso de 10 min, houve formação de um precipitado flocoso, o qual foi ressuspensão e a solução filtrada através de lã de vidro e papel de filtro. O líquido límpido foi filtrado através da membrana filtrante, sob vácuo.

1.7. Acidificação do ovo líquido com ácido clorídrico

Várias amostras de 10,0 ml da solução de ovo líquido diluída como no item 1.3, foram transferidas para tubos de ensaio e acrescidas de até 6,0 ml de solução de ácido clorídrico 0,1 N. Não ocorreu sedimentação ou formação de flocos. Analogamente ao tratamento feito com PEG, o ovo líquido foi submetido à filtração prévia através do conjunto lã de vidro e papel de filtro e, em seguida, através da membrana filtrante, sob vácuo.

2. TRATAMENTO DA CLARA DE OVO

2.1. Acidificação da clara com ácido clorídrico

Objetivando a precipitação da albumina, 10,0 ml da solução de clara de ovo, diluída de 4 vezes com água destilada, foi acrescido de 1,0 ml de ácido clorídrico 0,1 N, produzindo um pH de aproximadamente 4,8. Logo após a adição do ácido, foi iniciada a formação de flocos, os quais, após um repouso de 10 min, sedimentaram, deixando um sobrenadante transparente. A filtração foi feita primeiro em lã de vidro e papel de filtro qualitativo, utilizando um funil de vidro como suporte. Como filtra

do completamente transparente, foi feita a segunda filtração utilizando a membrana e vácuo.

2.2. Utilização de polietilenoglicol (PEG) como agente flocculante

A introdução de 1,0 ml de PEG a 20% em 10,0ml da solução de clara, preparada como no item 2.1, praticamente não alterou seu aspecto físico.

2.3. Utilização de proteases para a digestão da albumina da clara

Proteases de diferentes procedências foram testadas a fim de ser escolhida a que melhor se adaptasse às nossas condições de pesquisa. Foi investigada uma enzima que tivesse uma boa atividade à temperatura de 40° C e no pH natural da clara, da gema e do ovo líquido. A temperatura de 40° C foi escolhida porque acima dela a viabilidade das bactérias poderia ser comprometida. Foi mantido o pH natural da clara, da gema e do ovo líquido, pois o ajuste de pH para os valores de máxima atividade para algumas enzimas, iria aumentar o volume de trabalho e, com isso, dificultar o processo, que deveria ser o mais simples e rápido possível.

As enzimas estudadas foram: bromelina da Sigma, bromelina da Wako, papaína da Biobrás, pepsina da Merck, pepsina da Wako, Alcalase (protease bacteriana) e Neutrase (protease fúngica), ambas da Novo Industri.

2.3.1. Ação proteolítica no revestimento do filme fotográfico.

O teste foi realizado com a finalidade de avaliar

a eficiência das diferentes enzimas em digerir a camada de revestimento protéico depositada no filme, que dá ao mesmo sua coloração escura. A camada de proteína em contato com a solução enzimática é digerida, desprendendo-se do filme, o qual se torna transparente. A eficiência da enzima é analisada em função do tempo, isto é, quanto mais ativa a enzima sobre esse substrato, menor é o tempo de digestão e mais rapidamente o filme se torna transparente.

O filme foi cortado em quadrados com área de aproximadamente 25 mm^2 , introduzidos com pinça em tubos de ensaio contendo 1,0 ml de enzima a 0,1%, dois tubos para cada enzima, sendo que um deles foi mantido à temperatura ambiente (em torno de 25°C), e o outro em banho-maria a 40°C .

2.3.2. Escolha da enzima mais apropriada para as proteínas da clara

Após o experimento anterior foram selecionadas as enzimas bromelina da Sigma, papaína da Biobrás, "Alcalase" da Novo Industri e pepsina da Wako, a fim de, entre elas, ser escolhida aquela mais ativa para as proteínas da clara.

A quantificação do grau de hidrólise foi feita segundo o método preconizado por Anson⁷, que consiste na dosagem colorimétrica da tirosina liberada pela digestão enzimática das proteínas, de acordo com o seguinte procedimento:

- a. A clara foi diluída em água destilada 1:3 p/p para obtenção de um substrato com concentração protéica em torno de 2,5%⁷, admitindo que ela contenha de 10 a 11% de proteína.
- b. Volumes de 5,0 ml dessa solução de clara foram transferidos para 8 tubos de ensaio.

- c. Os tubos foram colocados em banho-maria a 40°C. Após ser atingido o equilíbrio térmico, em 4 dos tubos com solução de clara, foram introduzidas, respectivamente, bromelina, papaína e pepsina, em concentrações enzimáticas de 2,0 mg/ml e Alcalase a 0,00114 unidade Anson/ml, em cada solução.
- d. Os conteúdos dos tubos foram homogeneizados e deixados para digestão com agitação constante por 30 minutos a 40°C.
- e. Transcorrido o tempo de digestão, as reações foram interrompidas pela adição de 10,0 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,3 N, a cada um dos tubos.
- f. Os 4 tubos foram retirados do banho-maria, fechados com folha de papel alumínio e mantidos em geladeira por 3 horas a 5°C.
- g. Os outros 4 tubos contendo 5,0 ml de solução de clara, foram reservados para o ensaio em branco correspondente a cada enzima. Para tal, a adição de 10,0 ml da solução de TCA foi feita antes da introdução das enzimas.
- h. Os tubos do ensaio em branco também foram mantidos na geladeira por 3 horas a 5°C.
- i. Decorrido esse tempo de repouso, os conteúdos dos 8 tubos foram filtrados em papel de filtro qualitativo e dosada a tirosina em todos os filtrados.
- j. A dosagem da tirosina foi feita da seguinte maneira: 2,0 ml do material preparado foram transferidos para um tubo de ensaio, acrescidos de 4,0 ml de solução de hidróxido de sódio 0,5 N; 1,2 ml do reagente de Folin (obtido diluindo 3 vezes o produto comercial) e 2,8 ml de água destilada, totalizando um volume de 10,0 ml.

k. A absorbância foi medida entre 2 a 10 minutos, após a introdução do reagente de Folin, em fotocolorímetro com filtro vermelho (banda centrada em 660 nm).

As concentrações de tirosina foram calculadas por comparação com uma curva padrão construída a partir de soluções contendo 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg/ml de L-tirosina da Merck.

2.3.3. Estudo da cinética enzimática tendo a clara como substrato

O estudo da cinética foi feito para a bromelina e Alcalase; os parâmetros estudados foram temperatura, concentração e tempo. O objetivo destas experiências foi o de determinar as condições mais próximas das ideais para o nosso trabalho.

a. Escolha da temperatura adequada para a digestão.

Foram testadas as temperaturas de 35, 40 e 45°C, sendo o tempo de digestão fixado em 30 minutos. O efeito da temperatura na velocidade da hidrólise foi estudado apenas para a bromelina, uma vez que se dispunha destes dados na literatura para a Alcalase.

As experiências foram executadas de modo análogo às descritas no item 2.3.2.

b. Determinação da concentração ótima das enzimas

Tendo sido fixada a temperatura em 40°C e o tempo de digestão em 30 minutos, o passo seguinte foi a procura da razão enzima-substrato que nos proporcionasse resultados mais satisfatórios. Para tal foram empregadas concentrações de 0,03; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,30 mg de bromelina e 0,0114; 0,0228; 0,0342; 0,0456; 0,0570 e 0,0684 unidade Anson de Alcalase por mililitro de solução de clara, num volume total de 5,0 ml. No res

tante todo o procedimento foi análogo ao dos testes anteriores. Neste ensaio, para cada concentração, foi feito um teste em branco correspondente, visto que a quantidade de enzima introduzida podia influir na leitura da absorbância.

c. Escolha do tempo ótimo da reação

Empregando 0,20 mg ou 0,6 unidade Anson de bromelina e 0,0456 unidade Anson de Alcalase por mililitro de solução de clara, num volume total de 5,0 ml, foi feito o estudo referente ao efeito do tempo na proteólise. A temperatura utilizada foi de 40° C. A extensão da reação foi medida nos intervalos de 15, 30, 45 e 60 min de incubação.

3. TRATAMENTO DA GEMA DE OVO

3.1. Acidificação da gema com ácido clorídrico

Várias porções de 10,0 ml da solução de gema diluída (na razão de uma parte de gema para cinco de água destilada), foram transferidas para tubos de ensaio e acrescidas de até 6,0 ml de solução de ácido clorídrico 0,1 N. Não ocorreu sedimentação ou formação de flocos. Analogamente ao tratamento feito com a clara, a gema foi submetida à filtração prévia através do conjunto lã de vidro e papel de filtro e, em seguida, através da membrana filtrante, sob vácuo.

3.2. Utilização do PEG como agente flocculante

Volumes de 10,0 ml de gema, diluídos como no item 3.1, foram transferidos para tubos de ensaio e acrescidos de 1,0 ml de PEG a 20%. Após homogeneização e repouso de 10 min, houve formação de um precipitado flocoso, o qual foi resuspenso e a

solução filtrada através de lã de vidro e papel de filtro. O líquido límpido foi filtrado através da membrana filtrante, sob vácuo.

3.3. Utilização de proteases para digestão das proteínas da gema.

3.3.1. Escolha da enzima mais apropriada para as proteínas da gema.

A escolha foi realizada de maneira análoga à da clara. Para a obtenção de uma solução de gema com cerca de 2,5% de proteína, segundo a técnica preconizada por Anson⁷, a gema, que contém 16,1% de material protéico^{77, 82, 89}, foi diluída como no item 3.1.

3.3.2. Estudo da cinética enzimática

Os efeitos da temperatura, do tempo de incubação e da concentração das enzimas Alcalase e bromelina sobre as proteínas da gema, foram analisados mediante testes análogos aos feitos com a clara.

3.3.3. Utilização de lipases para a degradação de triglicerídios da gema

A gema, além de conter cerca de 16% de proteína³⁴, é constituída também de 31% de lipídios, dos quais 60 a 62% são triglicerídios⁸⁹, substâncias que atuam decisivamente na obstrução dos poros da membrana. Assim, foi procurada uma lipase que digerisse os triglicerídios da gema, tentando com isso melhorar a filtrabilidade. A atuação das lipases (do germe de trigo e da pancreatina) foi avaliada pelo método descrito em Methods of Enzymatic Analysis¹³, titulando os ácidos graxos liberados pela lipólise

com solução de hidróxido de sódio 0,0474 N, sendo os resultados dados em normalidade de ácidos graxos. Para esse ensaio a concentração das enzimas foi de 2,0 mg/ml de solução de gema preparada como no item 3.1. A lipólise foi realizada a 40° C por 30 min, sob agitação intermitente. Todo o ensaio foi realizado em duplicata e cada teste teve um branco correspondente para eliminar a influência da enzima na titulação.

Foi também testada a associação entre estas lipases e a bromelina, na razão de 1:1.

Os resultados preliminares demonstraram que a pancreatina possui maior atividade sobre a gema do que a lipase do germe de trigo. Em vista disso, foram feitos estudos cinéticos apenas com a pancreatina, verificando o efeito da temperatura, concentração e tempo na extensão da lipólise. As temperaturas, concentrações e tempos analisados foram de 30, 40 e 50° C; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 mg por mililitro de solução de gema e 15, 30, 45 e 60 minutos.

4. VERIFICAÇÃO DOS VOLUMES MÁXIMOS DE CLARA, DE GEMA E DE OVO LÍQUIDO, TRATADOS ENZIMATICAMENTE, FILTRÁVEIS ATRAVÉS DA MEMBRANA HAWG 47 mm.

Escolhidas as enzimas e estabelecidos os parâmetros a serem empregados, o próximo passo foi o de verificar o maior volume de clara, de gema e de ovo líquido possível de ser filtrado, após o tratamento enzimático estudado. Os diferentes volumes das amostras, diluídas e não diluídas, foram submetidos ao tratamento enzimático com as enzimas escolhidas e nas condições ótimas de tempo e temperatura, a saber, 45 min e 40°C, com agitação intermitente. Decorrido este tempo as amostras foram sub

metidas a filtração através da membrana filtrante.

Com o intuito de aumentar a filtrabilidade da gema e do ovo líquido, foi estudado o efeito da adição de hidróxido de sódio 0,05 N e de Tween 80 a 0,5% sobre as amostras digeridas, isto é, após o tratamento enzimático. Para 1,0 ml de gema e 2,5 ml de ovo líquido, foram adicionados volumes de 5,0 ml de Tween 80 e volumes variados de hidróxido de sódio, entre 1,0 e 5,0 ml. O efeito da adição foi avaliado em termos de tempo de filtração.

II - Ação das enzimas sobre a viabilidade de uma enterobactéria

Segundo Becker e Hartsell¹², as enzimas proteolíticas exercem efeitos letais sobre os microrganismos. Por este motivo, foi feito um estudo sobre o grau de recuperação da E. coli após a digestão enzimática da clara, da gema e do ovo líquido, inoculados artificialmente com este microrganismo. O estudo foi realizado com a E. coli podendo, no entanto, ser com qualquer bacilo Gram negativo, devido à semelhança na constituição da parede.

E. coli, obtida de uma cultura estoque, foi semeada em ágar nutriente e incubada por 24 h a 37° C e, deste crescimento, realizado um repique em Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI), que também foi incubado por 24 h a 37° C. Esta cultura foi diluída com salina para 10^{-6} , obtendo-se uma população microbiana em torno de 10^3 bactérias por mililitro. Desta concentração, porções de 1,0 a 5,0 ml foram empregadas para contaminar artificialmente 50,0 ml de amostra. Feita a homogeneização, as amostras inoculadas foram transferidas em duplicata para os tubos e levadas para um banho-maria a 40° C. Após o equilíbrio térmico,

foi adicionada água destilada estéril nos tubos controles e nos outros as soluções enzimáticas estéreis, em quantidades que resultassem em relações de concentração ótimas enzima/substrato. Os tubos testes e controles foram mantidos a 40° C durante 45 minutos, com agitação intermitente. Decorrido esse tempo, volumes de 0,1 e 1,0 ml do material de cada tubo foram transferidos para placas de Petri e vertido sobre eles o meio de ágar Endo fundido e resfriado até 50° C.

As placas foram incubadas a 35° C por 24 e 48 horas, sendo feita, então, a contagem das colônias que se desenvolveram.

III - Recuperação da enterobactéria *E. coli* através de diversos métodos de filtração.

Os métodos desenvolvidos para aumentar a filtrabilidade das amostras foram estudados verificando a viabilidade do seu emprego na recuperação de uma enterobactéria. Os seguintes tratamentos descritos anteriormente, que renderam volumes apreciáveis de filtração, foram analisados:

- . Solução de clara com ácido clorídrico 0,1 N e dupla filtração (item 2.1); clara com Alcalase, concentração 0,045 uA/ml, com temperatura e tempo de digestão de 40° C e 45 min (item 4); solução de ovo líquido com PEG a 20% e dupla filtração (item 1.6); ovo líquido com Alcalase, concentração 0,09 uA/ml, temperatura e tempo de digestão de 40° C e 45 min e adição de 2,0 ml de hidróxido de sódio 0,05 N e 5,0 ml de Tween 80 a 0,5% (item 4); Solução de gema com PEG a 20% e dupla filtração (item 3.2) e gema com Alcalase, concentração 0,15 uA/ml, temperatura e tempo de digestão de 40°C e 45 min e adição de 5,0 ml de hidróxido de sódio

dio 0,05 N e Tween 80 a 0,5%, 5,0 ml (item 4).

Para o estudo da recuperação da *E. coli*, o inóculo e as amostras contaminadas artificialmente com *E. coli* foram preparados como anteriormente e volumes de amostras inoculadas com *E. coli*, tratados por métodos acima discriminados, foram filtrados em membrana filtrante. Após a lavagem com água destilada esteril, as membranas foram transferidas para placas com ágar m Endo les e incubadas por 24 h a 35° C, após um pré-enriquecimento em caldo Lauril Sulfato por 1,5 h e 35° C. Segundo Grabow e Pre⁴³ez, no ágar m Endo les, há uma maior recuperação de *E. coli* debilitada. Para cada ensaio, foram feitos controles por plaqueamento em profundidade em ágar Endo, que foram incubados a 35° C por 24 h.

IV - Ensaio sobre a recuperação da *E. coli* e da *S. typhimurium*.

Após a padronização do método por nós desenvolvido, foram feitos diversos ensaios comparativos entre a técnica da membrana filtrante (MF) e métodos tradicionais empregados para a identificação e enumeração da *E. coli* e *S. typhimurium*, inoculadas artificialmente na clara e no ovo líquido. A pesquisa não foi realizada na gema devido à baixa recuperação dos microrganismos nesse material, evidenciadas nos ensaios anteriores (item III).

Como métodos comparativos de recuperação de *E. coli* inoculada experimentalmente na clara e no ovo líquido (preparados de acordo com o item II), foram empregadas as técnicas de plaqueamento em profundidade em ágar Endo e a do número mais provável com 3 séries de 5 tubos para cada diluição em caldo Lauril-Sulfato e confirmação de coliformes em caldo Bile-Verde Brilhante^{1, 50, 103}. A temperatura de incubação foi de 35° C e o tempo

de 24 h para cada ensaio.

Para a técnica da membrana filtrante, as amostras consistiam de 5,0 ml de clara e 2,5 ml de ovo líquido, empregando 0,045 e 0,090 unidade Anson de Alcalase por mililitro, respectivamente, para a digestão de cada um dos materiais. A digestão se processou durante 45 min a 40° C, em banho-maria e com agitação intermitente. No caso da clara, a digestão foi sucedida pela filtração em membrana HAWG 47 mm sob vácuo de 300 mm de mercúrio e a lavagem da membrana com água destilada estéril. No caso do ovo líquido, a filtração das amostras digeridas foi precedida pela adição de 5,0 ml de solução de Tween 80 a 5% e 2,0 ml de solução de hidróxido de sódio 0,05 N, ambas estéreis, após o que as membranas foram submetidas a lavagem com água destilada estéril. As membranas com *E. coli* foram submetidas a um pré-enriquecimento em placas com caldo Lauril Sulfato, incubadas a 35° C por 1,5 h e, em seguida, transferidas para ágar m Endo les e incubadas a 35° C por 18 a 24 h. Após este tempo, foi feita a contagem das colônias de *E. coli*, que se desenvolveram sobre a membrana com o brilho verde metálico característico.

Para a recuperação da *S. typhimurium* inoculada experimentalmente na clara e no ovo líquido (idem item II), foi empregado como método comparativo, a técnica clássica de pré-enriquecimento em caldo lactosado, enriquecimento em caldo tetratio nato, isolamento em ágar *Salmonella-Shigella* e ágar Verde Brilhante e prova sorológica⁶³. Na técnica de membrana filtrante, foi utilizado para a filtração procedimento semelhante àquele empregado no caso da *E. coli*. As membranas com *S. typhimurium* foram pré-enriquecidas em caldo m Tetratio nato por 3 horas a 35° C, transferidas para caldo m Verde Brilhante e incubadas por 15 h a 35° C. Após a incubação, as membranas com colônias de microrganismos foram colocadas sobre uma placa absorvente com reagente de uréia

e após 20 min feita a leitura da prova da urease. O procedimento descrito para a recuperação da salmonela em membrana filtrante foi conduzido segundo a orientação de Klaber e Clark⁵². Para a confirmação da identificação das salmonelas foram feitas reações sorológicas com soros antiflagelares e antissomáticos polivalentes, obtidos no Instituto Adolfo Lutz. Foram contadas apenas as colônias não-fermentadoras de lactose e que deram reação de urease negativa.

RESULTADOS

Os resultados obtidos após diversos tratamentos de clara, gema e ovo líquido, com a finalidade de aumentar o volume passível de filtração através da membrana filtrante HAWG 47 mm, são apresentados na tabela 1.

Tratando a clara com solução de ácido clorídrico e a gema e o ovo líquido com solução de PEG, foi possível filtrar volumes apreciáveis de amostra, sem obstruir os poros da membrana filtrante, desde que obedecida a proporcionalidade entre os volumes de reagentes e amostras. Após a primeira filtração em lâde vidro e papel de filtro qualitativo, o filtrado ficava completamente límpido e transparente.

Através do emprego das enzimas proteolíticas, das lipases ou de associações destes dois grupos de enzimas, houve aumento na filtrabilidade, devido à fragmentação das moléculas de proteínas e lipídios. O tratamento da clara com Alcalase permitiu a filtração de até 5,0 ml, volume este muito grande se partirmos do princípio de que apenas 0,02 ml de clara eram passíveis de filtração, no estado original, sem tratamento enzimático. No caso do ovo líquido e da gema, a introdução da solução de Tween 80 e de hidróxido de sódio, favoreceu muito a filtração, permitindo a passagem pelo filtro de um volume grande, a saber, 2,5 ml de ovo líquido e 1,0 ml de gema, quando da utilização da Alcalase.

I - Emprego de proteases para a digestão de proteínas da clara e da gema.

Na tabela 2 estão os resultados do teste realizado para avaliar a eficiência das diferentes enzimas em digerir a camada de revestimento protéico depositada no filtro fotográfico, às temperaturas de 25 e 40° C.

As enzimas Alcalase (Novo Industri), bromelina (Sigma), papaína (Biobrás) e pepsina (Wako), demonstraram ser as mais ativas na hidrólise da gelatina, nas condições de trabalho, descolorindo o filme fotográfico em 9, 10, 13 e 30 minutos, a 40° C. Esta primeira experiência serviu como triagem para a escolha das proteases mais ativas. As enzimas selecionadas foram, em seguida, submetidas a novos experimentos, com a finalidade de se escolher a mais eficiente para a hidrólise das proteínas de clara e de gema de ovos.

A eficiência da ação enzimática foi avaliada colorimetricamente pela dosagem de tirosina liberada na hidrólise das proteínas, mediante reação com reagente de Folin Ciocauteau. A leitura da absorbância da solução, foi comparada com uma curva padrão (figura 1) construída a partir de reação com solução de tirosina.

Na tabela 3 são mostrados os resultados da digestão das proteínas da gema e da clara de ovo pelas enzimas, expressos em micrograma de tirosina por mililitro de clara ou de gema.

Através do ensaio de digestão, expresso na tabela 3, foi verificado que a Alcalase e a bromelina apresentavam as maiores atividades. Em seguida, estas enzimas foram submetidas a estudos de cinética, com a finalidade de serem selecionadas as melhores condições de temperatura, concentração enzimática e tempo de digestão. Os resultados da atividade enzimática foram expressos em micrograma de tirosina liberada por mililitro de clara e de gema, sendo graficados nas figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

Com relação à concentração, o aumento gradativo da bromelina na solução foi acompanhado de maior liberação de tirosina, ao passo que para a Alcalase, acima de 0,0456 uA/ml, a ve

locidade de reação se tornou constante. Através dos resultados obtidos foi possível observar que a Alcalase, em concentrações muito mais baixas do que a bromelina, exerce atividade proteolítica maior na clara e na gema, nas condições pré-estabelecidas.

Quanto ao tempo, após 45 min de digestão a 40° C, nenhum ou apenas ligeiro aumento foi observado na produção de tirosina. Neste teste também, os resultados demonstraram a superioridade de ação da Alcalase em relação à bromelina, nas condições empregadas.

II - Utilização de lipases para a degradação de triglicerídios da gema.

Na tabela 4 estão expressas as normalidades de ácidos graxos provenientes da lipólise de triglicerídios pelas enzimas: lipase do germe de trigo e pancreatina.

A pancreatina mostrou ser mais eficiente do que a lipase do germe de trigo sobre os lipídios da gema, nas condições de estudo. A associação das lipases com bromelina também favoreceu a liberação de ácidos graxos.

O estudo da cinética para selecionar as melhores condições de temperatura, concentração enzimática e tempo de hidrólise, também foi realizado para a pancreatina e os resultados apresentados nas figuras 8, 9 e 10.

A variação da extensão da hidrólise das gorduras da gema, expressa pela concentração de ácidos graxos, foi pequena com o aumento de temperatura. Com relação ao tempo e concentração, 45 minutos e 4,0 mg de pancreatina por mililitro de solução de gema mostraram ser as condições mais adequadas.

Assim, através dos estudos de cinética, as seguintes condições ótimas de trabalho foram estabelecidas: temperatura de digestão 40° C; tempo de incubação 45 minutos; concentração de bromelina 2,0 mg, de Alcalase 0,046 uA e de pancreatina 3,0mg por mililitro de soluções de clara ou de gema com 2,5% de proteína.

Com esses parâmetros determinados, o passo seguinte do trabalho consistiu em verificar qual o maior volume de clara ou de ovo líquido capaz de ser filtrado através da membrana filtrante HAWG 47 mm, após o tratamento enzimático.

III - Verificação dos volumes máximos de clara, gema e ovo líquido, tratados enzimaticamente, filtráveis através da membrana HAWG 47 mm.

Os resultados, tratamentos e volumes de eleição estão expressos na tabela 5.

Quando o número de bactérias contaminantes é reduzido, o resultado de uma análise microbiológica de alimentos gozará de maior confiança quanto maior for o volume ou o peso da amostra utilizada. Tendo em vista este princípio, o trabalho foi prosseguido apenas com a Alcalase, que permitiu a filtração de 5,0 g de clara, 2,5 g de ovo líquido e 1,0 g de gema.

IV - Ação das enzimas sobre a viabilidade da *E. coli*.

Uma vez que o tratamento enzimático da clara, gema e ovo líquido, à temperatura de 40° C, poderia exercer efeito nocivo sobre a viabilidade dos microrganismos presentes, reduzin

do o número de bactérias recuperáveis na membrana , esse parâmetro foi estudado com a enzima Alcalase e os resultados estão expressos nas tabelas 6, 7 e 8. Fazendo a regressão linear dos valores experimentais, foram obtidos os seguintes coeficientes angulares, lineares e de correlação: 0,91, 3,5 e 0,99 para a clara; 1,1, -1,6 e 1,0 para a gema e 1,2, -7,9 e 0,98 para o ovo líquido.

A análise de regressão indica que a recuperação dos microrganismos após o tratamento enzimático não diferiu significativamente daquela obtida do material sem tratamento algum, visto que os coeficientes angulares das retas são próximos de 1,0.

O coeficiente de correlação de 0,99 no caso da clara, de 1,0 para a gema e de 0,98 no caso do ovo líquido, indicam que os resultados com e sem tratamento enzimático estão altamente correlacionados, não havendo dispersão apreciável dos pontos.

V - Recuperação da *E. coli* através dos diversos métodos de filtração.

A recuperação da *E. coli* na membrana filtrante foi realizada para os diferentes tratamentos e os resultados expressos nas tabelas 9, 10 e 11.

A recuperação da *E. coli* foi totalmente prejudicada quando a clara foi tratada com ácido clorídrico, a gema e o ovo líquido com PEG, tendo os microrganismos ficado retidos na lâmina de vidro com os componentes sólidos das amostras, mesmo depois de várias lavagens. O papel de filtro e a lâmina de vidro que receberam o material tratado foram submetidos a plaqueamento em ágar mEndo

les, tendo havido crescimento de *E. coli*, confirmando a suspeita.

Da mesma forma, na gema tratada com Alcalase e adicionada posteriormente de hidróxido de sódio e Tween 80, a recuperação da *E. coli* foi extremamente baixa. A introdução de 5,0 ml de hidróxido de sódio afetou sensivelmente as bactérias, devido ao pH do meio, comprovando a verificação que fizemos de que a recuperação desse microrganismo diminui quando é submetido a um pH acima de 10, mesmo que somente por 5 min.

Por outro lado, o tratamento da clara e do ovo líquido com solução enzimática, resultou numa recuperação de *E. coli*, na membrana filtrante, em valores próximos daqueles obtidos pela técnica de plaqueamento.

Devido a estes resultados, os ensaios posteriores foram realizados somente com a clara e o ovo líquido, deixando o estudo da gema para outra ocasião.

VI - Ensaios para a verificação da recuperação da *E. coli* da clara e do ovo líquido, pelos métodos clássicos e por aquele por nós desenvolvido.

Na tabela 12 estão os resultados da recuperação da *E. coli* da clara e do ovo líquido contaminados artificialmente, através dos métodos de plaqueamento em profundidade e membrana filtrante. A reta de regressão dos números de microrganismos recuperados da clara pelo método da membrana filtrante, em função dos recuperados pelo método de plaqueamento, mostra uma equivalência entre os dois procedimentos. Um coeficiente de correlação de 0,95 indica boa correlação dos resultados. O coeficiente angular de 0,99 e o linear de 0,50 são indicativos da similaridade entre

os resultados obtidos pelas duas técnicas.

A mesma análise de correlação feita na experiência com o ovo líquido, mostra que neste caso, embora o coeficiente de correlação seja de 0,98, indicando uma proporcionalidade entre os resultados dos dois métodos, um coeficiente angular de 0,39 traduz uma recuperação menor com o uso da técnica da membrana filtrante. O decréscimo porcentual na recuperação dos microrganismos do ovo líquido pelo método da membrana filtrante, em relação à recuperação no plaqueamento, é constante, o que permite que seja proposto um fator de correção multiplicativo de 2,6 para melhorar o resultado obtido com a membrana filtrante.

A tabela 13 apresenta resultados quanto à recuperação da *E. coli* pela técnica do número mais provável (NMP) e a da membrana filtrante. Fazendo a regressão linear dos valores experimentais foram obtidos, para a clara e o ovo líquido respectivamente, coeficientes de correlação de 0,70 e 0,83, coeficientes lineares de 3,7 e 0,21 e coeficientes angulares de 0,48 e 0,58. Para a regressão, os resultados dos dois últimos experimentos da clara foram excluídos, pois o número de colônias recuperadas na membrana filtrante estava muito além do recomendado⁴, prejudicando a contagem e fornecendo resultados mais baixos do que o NMP, porém não abaixo do limite inferior do intervalo.

A baixa correlação entre os resultados obtidos pelo método da membrana filtrante e pelo número mais provável (NMP), acreditamos seja devido ao fato de os valores fornecidos pelo NMP já se tratarem de resultados estatísticos, eles próprios afetados de uma razoável dispersão. Mesmo assim, todos os resultados fornecidos pela técnica da membrana filtrante na clara, se situaram dentro dos intervalos da densidade de população bacteriana (nível de confiança de 95%) obtidos pelo método de NMP.

VII - Ensaios para a verificação da recuperação da *S. typhimurium* da clara e do ovo líquido, contaminados artificialmente, pelo método clássico e pelo da membrana filtrante.

A tabela 14 apresenta resultados quanto à recuperação de *S. typhimurium* no ovo líquido através do método de enriquecimento e o da membrana filtrante. Apesar do sucesso da filtração, a recuperação de *S. thyphimurium* foi baixa para o ovo líquido. Provavelmente a introdução de álcali e de detergente afetou a salmonela de modo análogo ao que ocorreu com a *E. coli*, havendo necessidade de serem realizados novos estudos para o aprimoramento da técnica da membrana filtrante aplicada a esse material.

Os resultados da recuperação da *S. typhimurium* da clara, através dos métodos de enriquecimento e da membrana filtrante, estão na tabela 15. Os resultados demonstraram que quando as salmonelas estão presentes na clara em concentrações muito baixas, da ordem de 0,1 a 0,2 microrganismo por grama de amostra, não é possível a sua recuperação pela técnica da membrana filtrante, sendo possível detectar a sua presença pelo método de enriquecimento. Isto se deve ao fato de as massas de amostras utilizadas serem diferentes, isto é, 5,0 g de clara para a técnica da membrana e 25 g para a do enriquecimento. Porém, apesar de ter a quantidade de amostra como fator limitante, foi surpreendente a sensibilidade demonstrada pela técnica da membrana filtrante em relação à recuperação de baixa densidade de salmonelas na clara. Uma população microbiana de 0,3 ou 0,4 bactéria por grama de clara foi possível de ser recuperada a partir de 5,0 g de amostra, fornecendo uma contagem de 2 ou 3 salmonelas na membrana, identificadas pela prova de urease e pelos soros antifiagelar e antissomático polivalentes.

TABELA 1

Volume de material filtrado através da membrana HAWG 47 mm sob vácuo de 300 mm de mercúrio, em diferentes tratamentos

Tratamento	clara (ml)	ovo líquido (ml)	gema (ml)
sem tratamento	0,02	0,01	0,01
filtros não convencionais	-	0,02	-
alumina	-	0,02	-
terra diatomácea	-	0,02	-
Tween 80	-	0,05	-
acetato de chumbo	-	0,10	-
alumina + Tween 80	-	0,15	-
Celite + Tween 80	-	0,15	-
alumina + acetato de chumbo	-	0,20	-
Celite + acetato de chumbo	-	0,20	-
Tween 80 + acetato de chumbo	-	0,25	-
ácido clorídrico	10,0	1,0	0,8
Poli(etilenoglicol) (PEG)	1,0	10,0	10,0
pepsina Wako	1,2	0,8	0,8
papaína Biobrás	1,2	0,8	0,8
lipase de germe de trigo	-	1,0	1,0
pancreatina	-	1,0	1,0
bromelina Sigma	2,5	1,0	1,0
Alcalase Novo Industri	5,0	2,5	1,0
bromelina + pancreatina	-	1,0	1,0
bromelina + lipase	-	1,0	1,0
Alcalase + lipase	-	2,5	1,0
Alcalase + pancreatina	-	2,5	1,0

- ensaio não realizado

TABELA 2

Tempo de descoloramento do filme fotográfico pelas diferentes soluções enzimáticas, em duas temperaturas.

Enzima	tempo (minutos)	
	25° C	40° C
Alcalase Novo Industri	18	9
Bromelina Sigma	20	10
Bromelina Wako	> 120	90
Neutrase Novo Industri	> 120	100
Papaína Biobrás	28	13
Pepsina Wako	80	30
Pepsina Merck	120	65

TABELA 3

Atividade das enzimas sobre as proteínas da gema e da clara do ovo.

Enzima	Concentração de tirosina ($\mu\text{g/ml}$)	
	Gema	Clara
Alcalase	1395	249
bromelina	600	199
papaína	199	58
pepsina	77	35

Condições empregadas - volume de solução: 5,0 ml; temperatura de digestão: 40° C; tempo de digestão: 30 minutos e concentrações enzimáticas: de Alcalase 0,00114 uA/ml, de bromelina 2,0 mg/ml, de papaína 2,0 mg/ml, e de pepsina 2,0 mg/ml.

TABELA 4

Hidrólise de triglicerídios da gema de ovo

Enzimas	Normalidade de ácidos graxos
lipase do germe de trigo	0,002
pancreatina	0,020
lipase do germe de trigo + bromelina (1:1)	0,017
pancreatina + bromelina (1:1)	0,029

Condições empregadas - volume de solução: 5,0 ml; temperatura de digestão: 40° C; tempo de digestão: 30 minutos e concentração de enzima: 2,0 mg/ml

TABELA 5

Relação dos métodos de tratamento enzimático pré-filtração e quantidades máximas filtráveis de amostra.

amostra (g)	conc. de enzima	tempo incub. (min.)	temp. incub. (°C)	NaOH 0,05 N (ml)	Tween 80 0,5% (ml)	tempo filtr. (min)
ovo líquido 2,5	Alcalase 0,09 uA/ml	45	40	2,0	5,0	1,0
ovo líquido 2,5	pancreat. 2,0 mg	45	40	4,0	-	2,0
clara 5,0	Alcalase 0,045 uA/ml	45	40	-	-	1,0
clara 2,5	bromelina 2,0 mg	45	40	-	-	1,0
gema 1,0	Alcalase 0,15 uA/ml	45	40	3,0	5,0	2,0
gema 0,8	pancreat. 2,0 mg	45	40	5,0	5,0	1,0

TABELA 6

Influência da Alcalase na viabilidade da *E. coli* inoculada artificialmente na clara

Experimento	número de microrganismos/grama de clara	
	sem enzima	com enzima
1	10	13
2	14	10
3	16	20
4	30	35
5	52	48
6	53	54
7	68	70
8	85	77

Condições empregadas - temperatura e tempo de digestão: 40° C/45 minutos; concentração enzimática: 0,045 uA/ml; meio de cultura: ágar Endo e tempo e temperatura de incubação: 35° C/24 e 48 horas.

TABELA 7

Influência da Alcalase na viabilidade da *E. coli* inoculada artificialmente em ovo líquido.

Experimento	número de microrganismos/grama de ovo líquido	
	sem enzima	com enzima
1	15	12
2	16	20
3	17	11
4	35	34
5	50	32
6	90	100
7	100	115

Condições empregadas - temperatura e tempo de digestão: 40° C/45 minutos; concentração enzimática: 0,09 uA/g de ovo; meio de cultura: ágar Endo e temperatura e tempo de incubação: 35° C/24 horas.

TABELA 8

Influência da Alcalase na viabilidade da *E. coli* inoculada artificialmente na gema.

Experimento	número de microrganismos/grama de gema	
	sem enzima	com enzima
1	14	12
2	13	15
3	18	20
4	30	28
5	40	37
6	58	60
7	80	85

Condições empregadas - Temperatura e tempo de digestão: 40° C e 45 minutos; concentração enzimática: 0,15uA/ml; meio de cultura: ágar Endo; temperatura e tempo de incubação: 35° C e 24 e 48 horas.

TABELA 9

Recuperação da *E. coli* inoculada artificialmente na clara, submetida a dois tratamentos diferentes e filtrada através da membrana HAWG 47 mm, sob vácuo de 300 mm Hg.

5626/BC

Experimentos	número de <i>E. coli</i> /grama de clara		
	plaqueamento	a	b
1	11	1	10
2	21	3	21

- a. Solução de clara com ácido clorídrico 0,1 N e dupla filtração.
 b. Clara com Alcalase, concentração 0,045 uA/ml, com temperatura e tempo de digestão de 40° C e 45 min.

Condições empregadas na experiência: - meios de cultura: plaqueamento em ágar Endo e membrana filtrante em ágar m Endo les; temperatura e tempo de incubação: 35° C, 24 e 48 horas.

TABELA 10

Recuperação da *E. coli* inoculada artificialmente no ovo líquido, submetida a dois tratamentos diferentes e filtrada através da membrana HAWG 47 mm.

Experimentos	número de <i>E. coli</i> /grama de ovo líquido		
	plaqueamento	c	d
1	15	0	12
2	20	2	15

c. Solução de ovo líquido com PEG a 20% e dupla filtração.

d. Ovo líquido com Alcalase, concentração 0,09 uA/ml, temperatura e tempo de digestão de 40° C e 45 min. e adição de 2,0 ml de hidróxido de sódio 0,05 N e 5,0 ml de Tween 80 a 0,5%

Condições empregadas na experiência - meios de cultura: plaqueamento em ágar Endo e membrana filtrante em ágar m Endo les; temperatura e tempo de incubação: 35° C, 24 e 48 horas.

TABELA 11

Recuperação da *E. coli* inoculada na gema após dois tratamentos diferentes e retida na membrana HAWG 47 mm.

Experimentos	número de <i>E. coli</i> /grama de gema		
	plaqueamento	e	f
1	20	2	1
2	50	4	5

e. Solução de gema com PEG a 20% e dupla filtração.

f. Gema com Alcalase, concentração 0,15 uA/ml, temperatura e tempo de digestão de 40° C e 45 min. e adição de 5,0 ml de hidróxido de sódio 0,05 N e Tween 80 a 0,5%, 5,0 ml.

Condições empregadas - Plaqueamento em ágar Endo e membrana filtrante em ágar Endo les. temperatura e tempo de incubação: 35° C 24 e 48 horas.

TABELA 12

Recuperação da *E. Coli* inoculada artificialmente pelos métodos de plaqueamento e de membrana filtrante (MF)

Clara (bactérias recuperadas)			Ovo líquido (bactérias recuperadas)		
Membrana filtrante		Plaqueamento (1 g)	Membrana filtrante		Plaqueamento (1 g)
(5 g)	(1 g)		(2,5 g)	(1 g)	
60	12	18	24	9,6	28
65	13	11	25	10	21
77	15	18	27	11	17
90	18	17	28	11	21
160	32	30	52	21	60
200	40	45	55	22	55
200	40	30	57	23	30
240	48	52	62	25	50
250	50	45	63	25	39
270	54	53	95	38	59
-	-	300	285	114	280

Condições empregadas - quantidade de clara na técnica de MF: 5,0 g; quantidade de ovo líquido na técnica de MF: 2,5 g; quantidade de clara no método de plaqueamento: 1,0 g e quantidade de ovo líquido no método de plaqueamento: 1,0 g.

TABELA 13

Recuperação da *E. coli*, inoculada artificialmente, pelos métodos de número mais provável (NMP) e de membrana filtrante (MF).

Clara (bactérias recuperadas)					Ovo líquido (bactérias recuperadas)				
MF		NMP	LI	LS	MF		NMP	LI	LS
(5 g)	(g)				(2,5g)	(g)			
20	4,0	3,3	1,1	9,3	3	1	13,0	3,5	30,0
26	5,1	4,9	1,7	12,6	3	1	24,0	6,8	73,4
30	6,0	7,2	2,3	18,4	5	2	7,9	2,3	18,7
30	6,0	7,9	2,3	18,7	5	2	4,9	1,7	12,6
35	7,0	3,3	1,1	9,3	6	2	10,9	3,1	25,1
40	8,0	9,4	2,8	21,9	15	6,0	4,6	1,6	12,0
46	9,1	13,0	3,5	30,0	20	8,0	17,2	4,1	48,4
50	10,0	9,4	2,8	21,9	48	19	21,2	5,3	66,9
50	10,0	7,9	2,3	48,4	100	40,0	27,8	9,0	84,9
ñ cont.	ñ cont.	3,3	1,1	9,3	125	50,0	92,0	21,0	300,0
400	80,0	160,9	80,0	-	-	-	10,9	3,1	25,1
470	95,0	160,9	80,0	-	ñ cont.	ñ cont.	10,9	3,1	25,1

ñ cont.: não contável, quando ocorreu sobreposição das colônias ou delimitação imprecisa das mesmas.

- : quando não houve crescimento de colônias com característica de *E. coli* sobre a MF.

LI : limite inferior

LS : limite superior

TABELA 14

Recuperação da *S. typhimurium* inoculada artificialmente no ovo líquido através do método de enriquecimento e do método da membrana filtrante.

Bactérias inoculadas por grama de ovo líquido	Bactérias recuperadas na membrana filtrante		Enriquecimento (25 g)	
	(2,5 g)	(1 g)	água SS	água VB
8	21	8	+	+
8	26	10	+	+
7	2	1	+	+
6	5	2	+	+
8	8	3	+	+
6	7	3	+	+
9	2	1	+	+
10	3	1	+	+
8	2	1	+	+
7	-	-	+	+
0,1	-	-	+	+
0,3	-	-	+	+
0,3	-	-	+	+
0,4	-	-	+	+
0,5	-	-	+	+

crescimento positivo +

ausência de crescimento -

TABELA 15

Recuperação da *S. typhimurium* inoculada artificialmente na clara, pelo método clássico de enriquecimento e pela técnica de membrana filtrante.

Bactérias inoculadas por grama de clara	Bactérias recuperadas na membrana filtrante		Enriquecimento (25 g)	
	(5 g)	(1 g)	água SS	água VB
0,1	-	-	+	+
0,1	-	-	+	+
0,1	-	-	+	+
0,3	3	1	+	+
0,4	2	1	+	+
0,4	2	1	+	+
0,5	4	1	+	+
4	12	2,5	+	+
5	34	6,8	+	+
6	14	2,8	+	+
8	35	7,0	+	+
9	41	8,2	+	+
15	65	13	+	+
17	60	12	+	+
20	80	16	+	+

crescimento positivo +

ausência de crescimento -

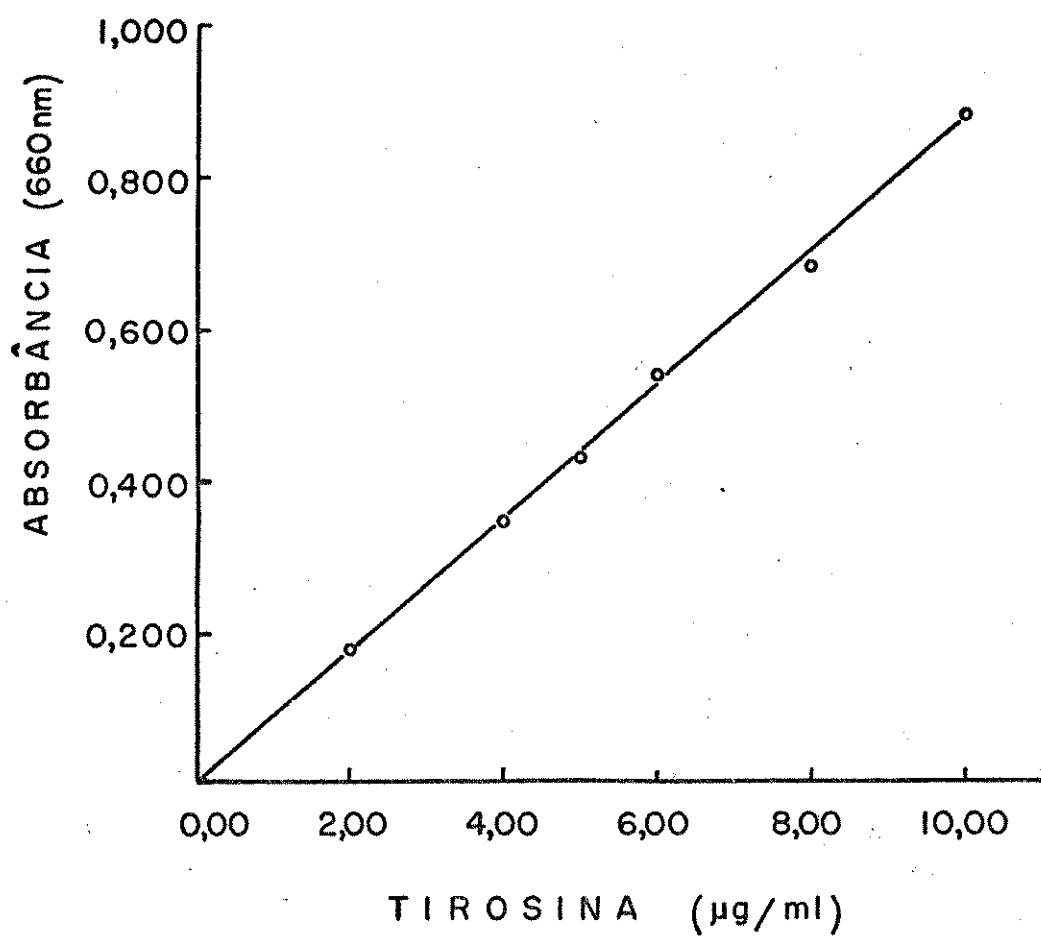


FIGURA 1 - Curva padrão da dosagem de tirosina, com o reagente de Folin-Ciocalteu.

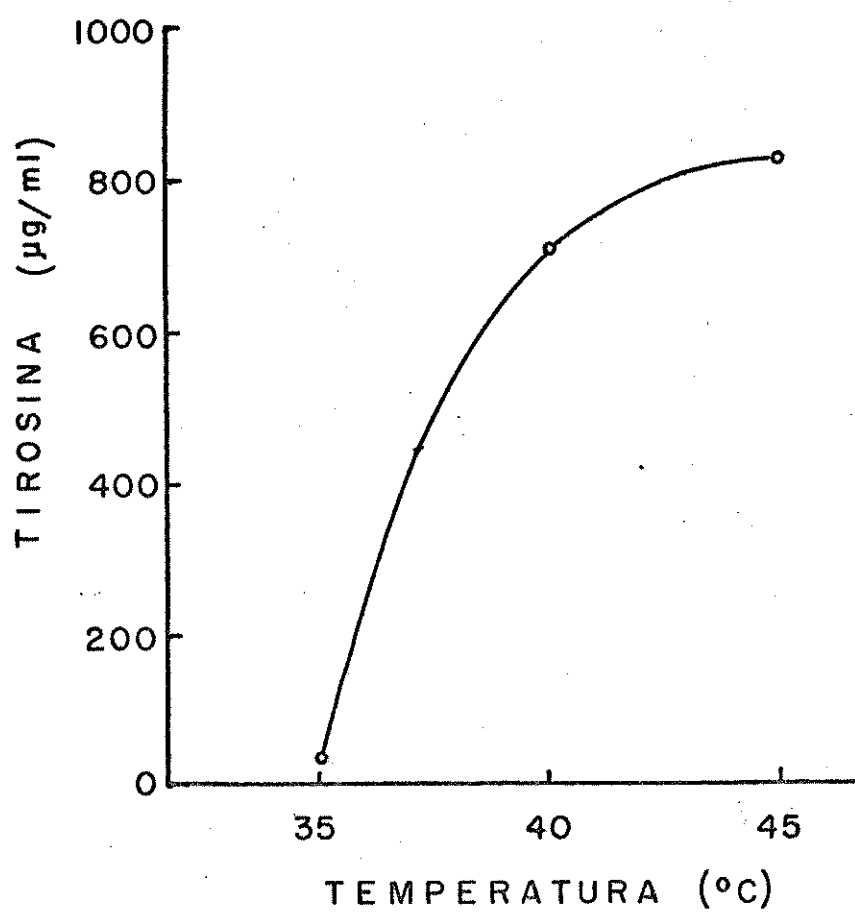


FIGURA 2 - Efeito da temperatura sobre a ativi
dade da bromelina em gema de ovo.

Tempo de digestão: 30 min.

Concentração de enzima: 2,0 mg/ml

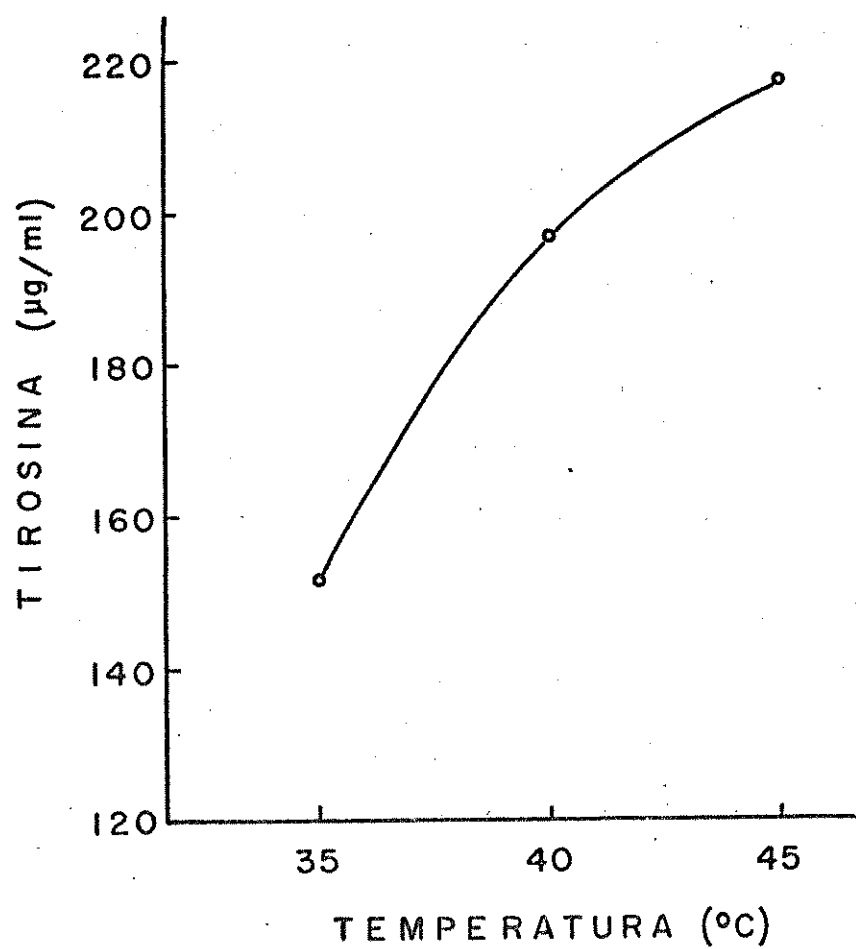


FIGURA 3 - Efeito da temperatura na atividade da bromelina sobre as proteínas da clara de ovo.

Tempo de digestão: 30 min.

Concentração de enzima: 2,0 mg/ml.

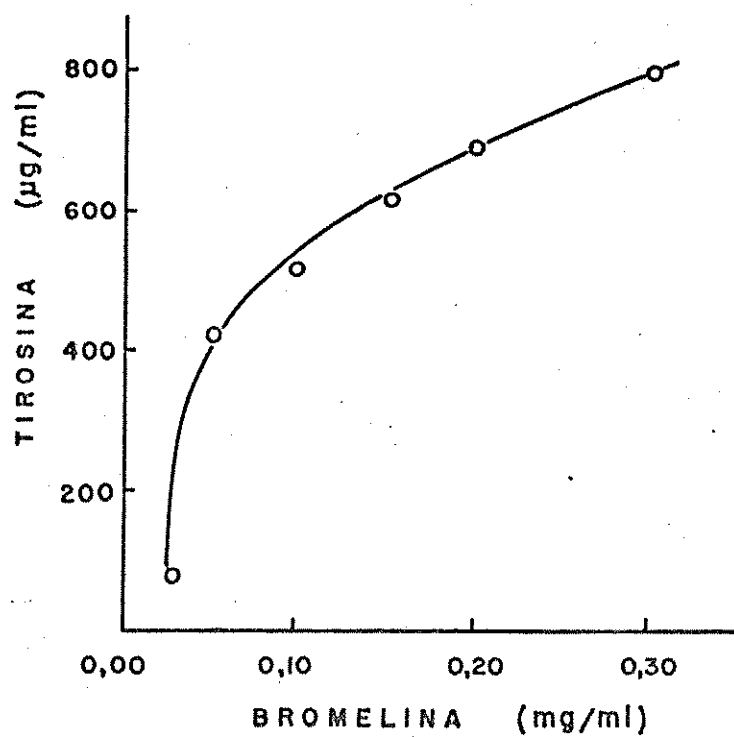


FIGURA 4 - Efeito da concentração de bromelina sobre a extensão da proteólise na gema, a 40°C por 30 min.

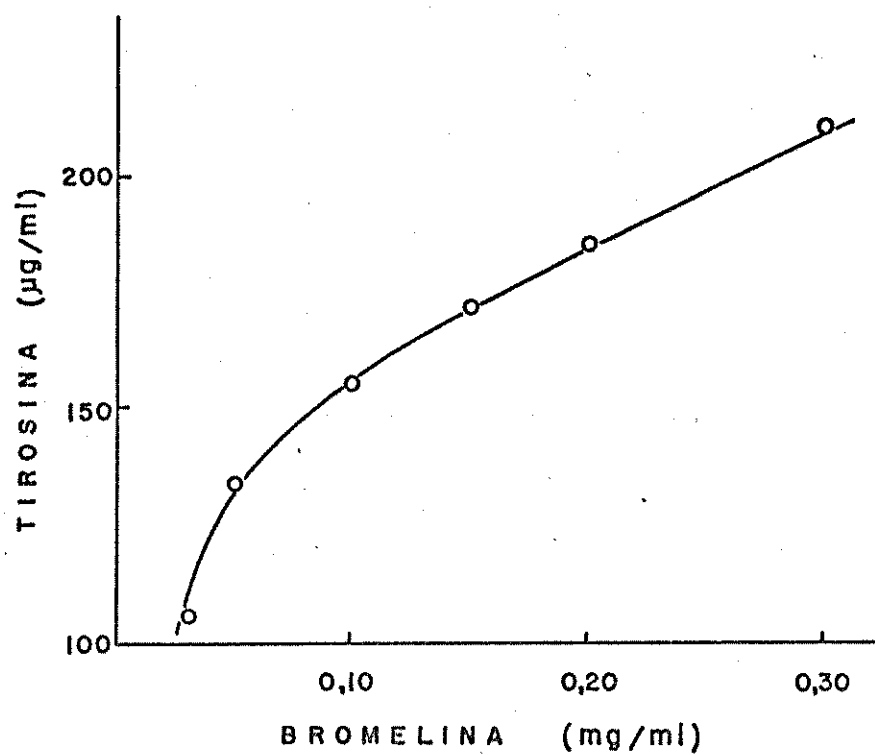


FIGURA 5 -- Efeito da concentração de bromelina so
bre a extensão da proteólise na clara,
a 40° C por 30 min.

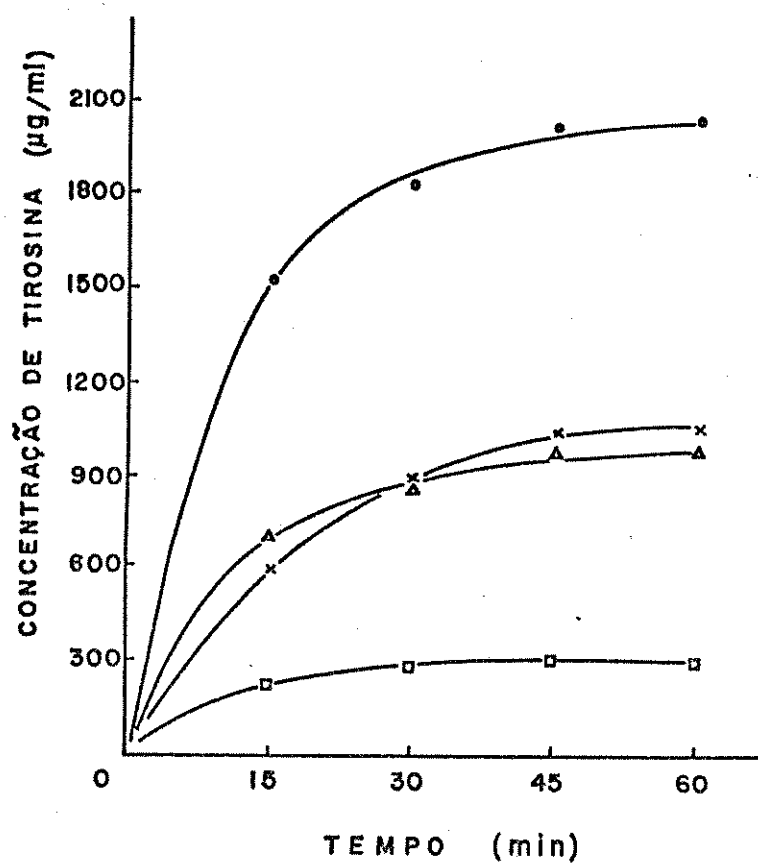


FIGURA 6 - Extensão da proteólise em função do tempo, a 40° C.

- gema com Alcalase, 0,0456 unidade Anson/ml
- × clara com Alcalase, 0,0456 unidade Anson/ml
- △ gema com bromelina, 0,2 mg/ml ou 0,6 unidade Anson/ml
- clara com bromelina, 0,2 mg/ml ou 0,6 unidade Anson/ml

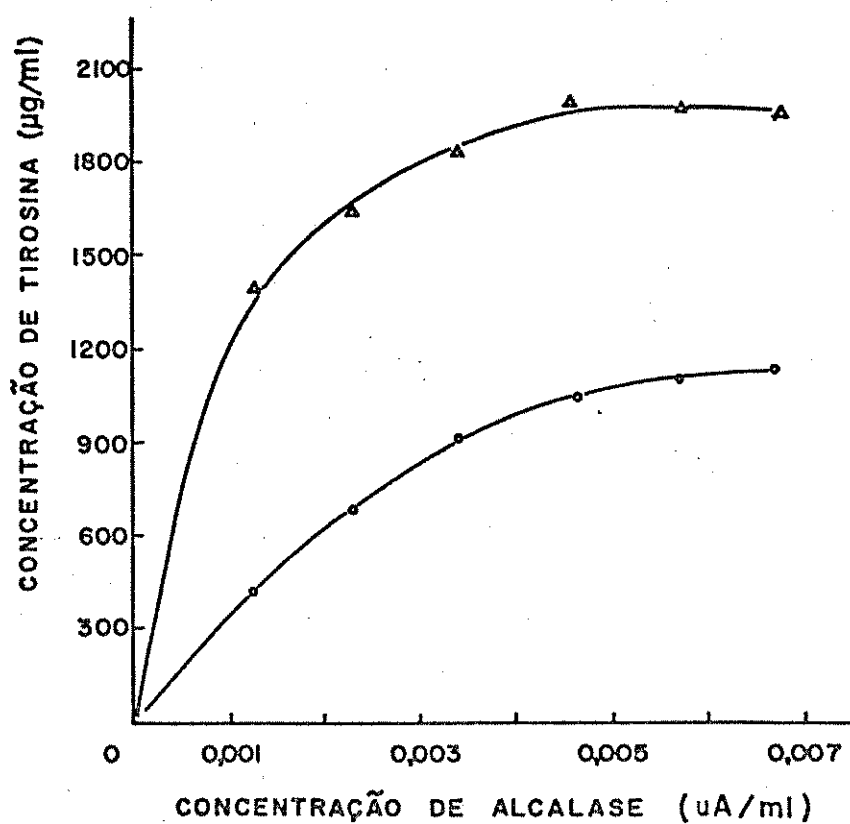


FIGURA 7 - Efeito da concentração de Alcalase sobre a extensão da proteólise, a 40° C por 30 min.

Δ gema
○ clara

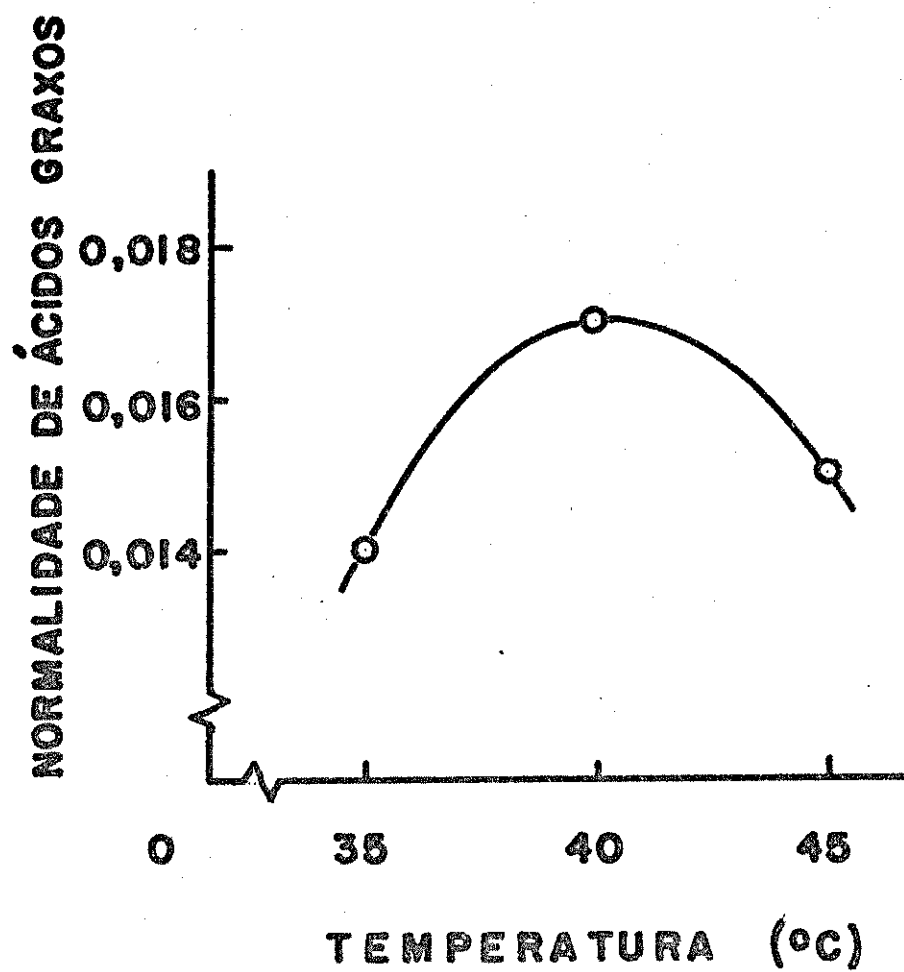


FIGURA 8 - Extensão da lipólise causada pela pancreatina na gema, em função da temperatura.

Tempo de digestão: 30 min.

Concentração de enzima: 2,0 mg/ml.

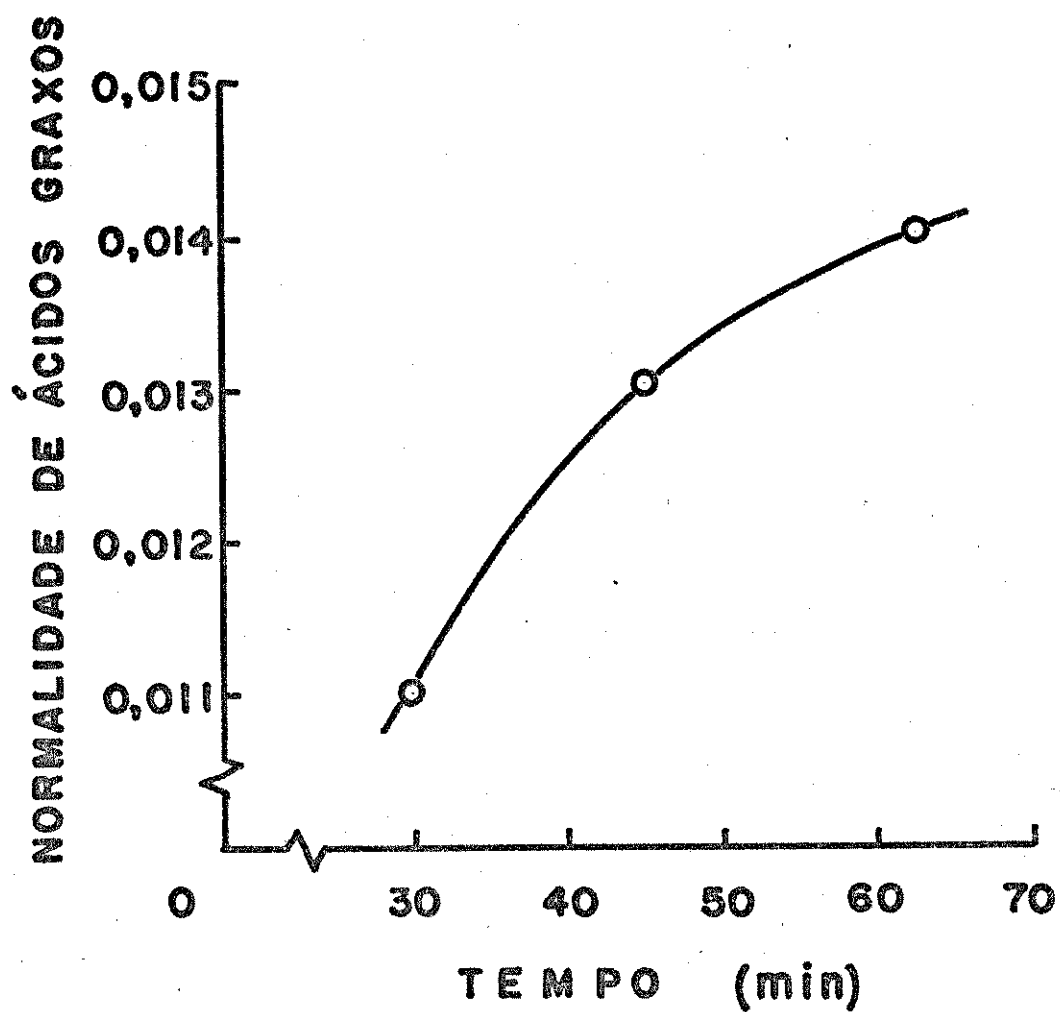


FIGURA 9 - Extensão da lipólise causada pela pancreatina na gema, em função do tempo.

Temperatura de digestão: 40° C.

Concentração de enzima: 2,0 mg/ml.

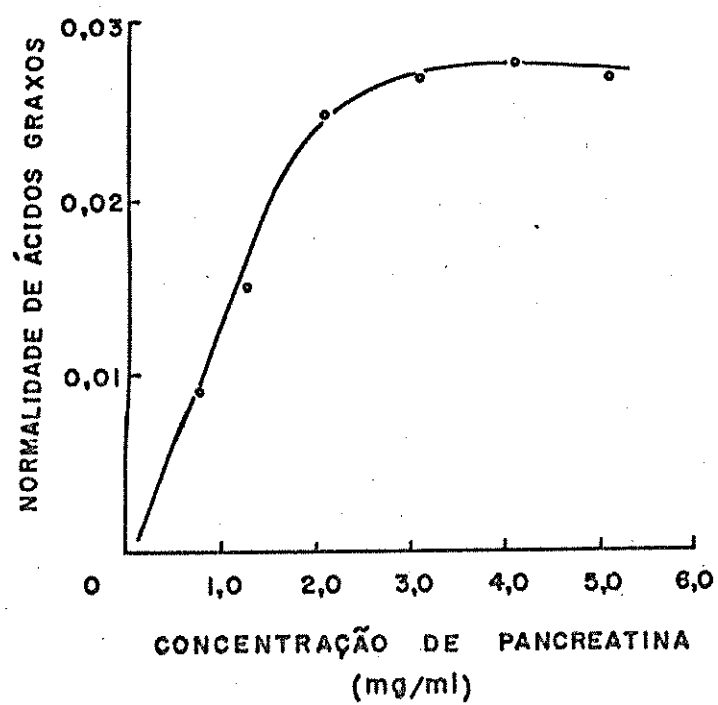


FIGURA 10 - Efeito da concentração de pancreatina sobre a extensão da lipólise na gema, a 40° C por 45 min.

DISCUSSÃO

Pela análise da tabela 1, verifica-se que volumes consideráveis de amostra podem ser filtrados através da membrana HAWG 47 mm com poros de 0,45 μ m, após tratamento da clara com ácido clorídrico ou da gema e do ovo líquido com polietilenoglicol. Porém, a recuperação de *E. coli* foi prejudicada com esses tratamentos, como mostram os resultados expressos nas tabelas 9 e 10. A introdução de ácido clorídrico na clara provoca a queda do pH até o ponto isoelétrico da albumina, com sua consequente aglutinação e precipitação⁸⁹, carreando consigo as bactérias. Além do aprisionamento mecânico, a retenção microbiana pode, também, advir da presença de polissacarídeos na parede celular destas bactérias Gram negativas, conferindo às mesmas cargas elétricas negativas, fazendo com que sejam retidas nas estruturas das proteínas precipitadas, por interação eletrostática (*). Quanto à utilização de polietilenoglicol (PEG) na gema, deve-se lembrar que este é empregado rotineiramente para a recuperação de vírus em alimentos⁷⁸, provocando a floculação de lipoproteínas pela ação do polieletrólito. Provavelmente por um mecanismo semelhante, a *E. coli* ficou retida nas malhas formadas pelas proteínas agregadas, resultando numa baixa recuperação na membrana filtrante.

Com relação aos resultados expressos nas tabelas 5, 12 e 15, foi verificado que é possível a filtração de volumes apreciáveis de amostra, da ordem de 5,0 g de clara, através da membrana filtrante, após tratamentos adequados, sem contudo reduzir o número de microrganismos viáveis. Outros autores, desenvolvendo trabalhos similares, verificaram a possibilidade de filtrar até 5,0 g de leite em pó desnatado⁸⁴, 0,5 g de carne moída⁹³, 0,7 g de ervilha⁹³ e 5,0 g de gelatina²⁰, desmistificando, assim, a crença da impossibilidade do uso da membrana filtrante em alimen

(*) CANHOZ, P.C. - Comunicação pessoal.

tos.

Quanto à recuperação da *E. coli* na membrana filtrante, as tabelas 12 e 13 mostram que num material com densidade alta de *E. coli* a contagem é prejudicada, fornecendo resultados mais baixos do que os dos métodos tradicionais, como o do plaqueamento em profundidade e do número mais provável (NMP). Este fato está de acordo com recomendação da American Public Health Association⁴, a qual diz que o número de coliformes recuperados na membrana não deve ultrapassar o de 80, exatamente por causa da dificuldade de contagem quando a densidade populacional é alta. Para contornar este inconveniente, Sharpe e Michaud⁹¹ propuseram a utilização da "Hidrofobic Grid Membrane Filter", que permite contagens de até 10^3 microrganismos, devido aos inúmeros retículos de cera impressos sobre a membrana.

Observando as tabelas 10, 11, 12 e 14, verifica-se que a introdução de álcali e detergente na gema e no ovo líquido tem efeito prejudicial na recuperação da *E. coli* e da *S. typhimurium*. Por outro lado, as tabelas 6, 7 e 8 indicam que uma proteólise de 45 min. a 40° C com "Alcalase" não afeta a viabilidade da *E. coli* presente na clara, na gema ou no ovo líquido. A clara, que tem como componentes secos praticamente apenas substâncias protéicas³⁴, forneceu resultados excelentes de filtração e recuperação de microrganismos com a proteólise. A gema e o ovo líquido, ambos com altos teores de material graxo⁸⁹, além da digestão protéica necessitaram de outros tratamentos, como elevação do pH e emprego de detergente, para favorecer a filtração; porém, tais procedimentos são prejudiciais às bactérias Gram negativas. Em experimentos prévios já havíamos verificado a menor recuperação da *E. coli* quando mantida em um pH acima de 10, mesmo que somente por 5 min.

Assim, para melhorar os resultados da técnica da membrana filtrante para o ovo líquido e principalmente para a gema, será necessário procurar uma lipase mais eficaz do que as por nós utilizadas, ou adição de outras substâncias menos prejudiciais. Desta forma, resultados semelhantes àqueles da clara poderão ser alcançados tanto para o ovo líquido, sem a necessidade do fator de correção, como para a gema, cujo índice de recuperação foi baixíssimo.

Com relação à tabela 15, resultados surpreendentes, como a recuperação de *S. typhimurium* presente na clara numa concentração da ordem de 0,3 a 0,5 microrganismo por grama, foram observados. Isto demonstra a sensibilidade da técnica da membrana filtrante em recuperar salmonelas presentes em baixas densidades em alimentos.

A necessidade de quantificar *Salmonella* nos alimentos tem sido alertada por diversos autores^{24, 47, 65}, sendo realizadas tentativas de enumeração utilizando métodos de NMP ou de plaqueamento de superfície em ágar seletivo. Inconvenientes como quantidade de amostra muito pequena (0,01 g) e interferências na leitura com crescimento de contaminantes, foram citados para o método de plaqueamento⁷⁴, assim como dificuldades inerentes ao método do NMP^{74, 94, 97, 109}.

Assim, tornava-se urgente encontrar um método reprodutível em qualquer laboratório de microbiologia de alimentos, sem onerar muito a pesquisa de rotina ou exigir pessoas altamente qualificadas para tal.

Kirkham e Hartman⁵³, em 1962, já alertavam sobre a viabilidade do emprego da membrana filtrante para o isolamento de salmonelas de albumina de ovo desidratado. Esta era tratada com protease e celite; porém, foi observada baixa reprodutividade

em 10,0 g de amostra.

Com a técnica por nós desenvolvida, utilizando-se 5,0 g de clara, foi possível quantificar a presença de até 0,3 *S. typhimurium* por grama de amostra. Por outro lado, numa clara com um número igual ou superior ao de 100 *Salmonella* por grama de amostra, é necessário a filtração de apenas 1,0 g de clara através da membrana. Desta maneira, pela técnica da membrana filtrante, utilizando-se 2 membranas e amostragem de 1,0 e 5,0 gramas de clara, é possível cobrir uma faixa de 0,3 a 100 salmonelas por grama. Concentrações acima desse valor já se situam dentro do limite de sensibilidade do método de plaqueamento.

Devido à facilidade da realização da técnica da membrana filtrante, reduzida quantidade de vidraria e de meios de cultura utilizados, rapidez nos resultados, eliminação de inibidores ou componentes que alteram a seletividade do meio e clareza na contagem das colônias isoladas de *E. coli* e *S. typhimurium*, que cresceram sobre a membrana nos meios de culturas diferenciais, essa técnica poderá vir a ser uma ferramenta de trabalho muito útil para os microbiologistas de alimentos

CONCLUSÕES

1. A utilização da técnica da membrana filtrante na clara é perfeitamente viável para a identificação da *E. coli*, mesmo em concentrações baixas, da ordem de um microrganismo por grama de clara, utilizando a protease bacteriana "Alcalase" na concentração de 0,045 unidade Anson/ml e submetida a digestão por 45 min a 40° C. A contagem das colônias sobre a membrana com características de *E. coli*, pode ser realizada após 16 a 18 h de crescimento nos meios seletivos diferenciais; a obtenção de colônias isoladas permite a transferência direta dos microrganismos para os meios apropriados para a realização das provas bioquímicas.
2. A recuperação da *S. typhimurium* pela técnica da membrana filtrante é de grande interesse, visto ser um método rápido, sensível e prático de quantificar este microrganismo, até em concentrações de 0,3 bactéria por grama de amostra com filtração de 5,0 g de clara. A digestão da clara por 45 min a 40°C com 0,045 unidade Anson/ml de "Alcalase", não afeta a viabilidade do microrganismo. Com a transferência da própria membrana, do meio de enriquecimento para o meio seletivo-diferenciador e depois para o meio da prova de urease, fica simplificado o trabalho do microbiologista.
3. A utilização da técnica da membrana filtrante para a identicação e a enumeração da *E. coli* no ovo líquido, é viável, com limitações em termos de recuperação, sendo necessária a introdução de um fator de correção. O emprego da "Alcalase" na concentração de 0,09 unidade Anson/ml de ovo líquido, para a digestão protéica, por 45 min a 40° C, não afeta a viabilidade do microrganismo; porém a introdução de 5,0 ml de Tween 80 a 0,5% e de 2,0 ml de hidróxido de sódio 0,05 N, reduz a recuperação das bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

1. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTRY. Washington - Method 42 - 5. Washington, 1969, p. 1-5.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - Detection and identification of Salmonella in egg products. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 50:231, 1967.
3. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. New York - Recommended methods for the microbiological examination of foods. 2. ed. New York, 1966.
4. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION.. New York - Standard methods for the examination of water and wastewater. 13. ed. New York, 1971. p. 189-208.
5. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. New York - Standard methods for the examination of water and wastewater. 14.ed. New York, 1976. p. 678 - 88.
6. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. New York - Standard methods for the examinatio of water and wastewater. 15.ed. New York, 1980. p. 1134.
7. ANSON, M.L. & MIRSKY, A.E. The estimation of pepsin with hemoglobin. J. gen. Physiol., 16:59 - 63, 1932.

(*) De acordo com as normas do Grupo Biomédico da Associação Paulista de Bi
bliotecários.

8. BANWART, G.J. & AYRES, J.C. Effects of various enrichment broths and selective agars upon the growth of several species of *Salmonella*. Appl. Microbiol., 1:296 - 301, 1953.
9. BANWART, G.J. & KREITZER, M.J. Rapid Determination of *Salmonella* in samples of egg noodles, cake mixes, and candies. Appl. Microbiol., 18:838-42, 1969.
10. BARBER, F.W. et alii - The Millipore Filter Technique in the dairy industry. J. Milk Food Technol., 17:109 - 12, 1954.
11. BARTLEY, T.D. et alii - Membrane filter technique, for the isolation of *Yersinia enterocolitica*. Appl. environ. Microbiol., 43:829-34, 1982.
12. BECKER, M.E. & HARTSELL, S.E. The synergistic action of lysozyme and trypsin in bacteriolysis. Arch. Biochem. Biophys., 55 : 257 - 69, 1955.
13. BIER, M. Lipases, In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O., ed. - Methods in enzymology. New York, Academic Press. 1955. v. 1, p. 627-41.
14. BOARD, R.G. - Microbiology of the hen's egg. Adv. appl. Microbiol., 11 : 245 - 81, 1969.
15. BODILY, H.L. et alii, ed. - Diagnostic procedures for bacterial, mycotic, and parasitic infections. 5. ed. New York, American Public Health Association, 1970. p. 305.
16. BRASÍLIA. COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS. Resolução nº 13, de março de 1978. Diário Oficial da União, 25 Julho 1978.

17. BUSTA, F.F. & SPECK, M.L. - Enumeration of *Bacillus stearothermophilus* by use of membrane filter techniques to eliminate inhibitors present in milk. Appl. Microbiol., 13 : 1043 - 44, 1965.
18. BUTTIAUX, R. & MOSSEL, D.A.A. - The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water. J. appl. Bacteriol., 24 : 353, 1961.
19. BYRNE, A.F. et alii - Methods for the detection and estimation of numbers of *Salmonella* in dried eggs and other food products. Appl. Microbiol., 3 : 368 - 72, 1955.
20. CHESWORTH, K.A.C. et alii - An enzymic technique for the microbiological examination of pharmaceutical gelatin. J. Pharm. Pharmacol., 29 : 60 - 61, 1977.
21. CLARK, C.W. & ORDAL, Z.J. - Thermal injured and recovery of *Salmonella typhimurium* and its effect on enumeration procedures. Appl. Microbiol., 18 : 332 - 36, 1969.
22. COSTA, G.A. et alii - Comparação de meios seletivo-indicadores e de enriquecimento usados no isolamento de enterobactérias patogênicas. An. Microbiol., 5 : 239 - 304, 1957.
23. COUSINS, C.M. et alii - A rapid method for counting bacteria in raw milk. Dairy Ind. Int., 44 : 27 - 39, Apr. 1979.
24. D'AOUST, J.Y. - Limitations of lysine - iron - cystine neutral red broth in the presumptive identification of *Salmonella*. Appl. environ. Microbiol., 34 : 595 - 96, 1977.
25. EDEL, W. & KAMPELMACHER, E.H. - Comparative studies on the isolation of sublethally injured *Salmonellae* in mine European Laboratory. Bull. World Health Organiz., 48:167, 1973.

26. EHRLICH, R. - Membrane filter method for determination of coliforms in pasteurized and certified milk. J. Milk Food Technol., 16 : 6 - 8, 1953.
27. ENTIS, P. et alii - Rapid detection of *Salmonella* sp in food by use of the ISO-GRID hydrophobic grid membrane filter. Appl. environ. Microbiol., 43 : 261 - 68, 1982.
28. EVANS, T.M. et alii - Impact of verification media and resuscitation on accuracy of the membrane filter total coliform enumeration technique. Appl. Environ. Microbiol., 41:1144-51, 1981.
29. FALCÃO, D.P. - Meio modificado de cultura para caracterização de *Salmonella* lactose positiva. Rev. Saúde públ. 10:65-73, 1976.
30. FALCÃO, D.P. & SUASSUNA, I. - Crescimento e viabilidade de *Salmonella* em diversas variações do meio de Rappaport. Rev. Microbiol., 1 : 13 - 18, 1970.
31. FALCÃO, D.P. et alii - Avaliação do meio ágar xitose lisina verde brilhante no isolamento de *Salmonella*. Rev. Saúde públ., 13 : 43 - 46, 1979.
32. FIFIELD, C.M. et alii - The Millipore filter for enumerating coliform organisms in milk. J. Dairy Sci., 40 : 588 - 89, 1957.
33. FITTS, R. et alii - DNA - DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* sp in foods. Appl. environ. Microbiol., 46 : 1146 - 51, 1983.

34. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Roma - Amino-acid content of foods and biological data on proteins. Roma, 1970. (FAO Nutritional Studies n° 24).
35. FORSYTHE R.H. et alii - Salmonellae recovery following gastrointestinal and ovarian inoculation in the domestic fowl. Poultry Sci., 46 : 849 -55, 1967.
36. FUNK, E.M. et alii - Minimizing spoilage in shell eggs by thermostabilization. Poultry Sci., 33 : 532 - 38, 1954.
37. GABIS, D.A. & SILLIKER, J.H. - ICMSF Method studies. II Comparison of analytical schemes for detection of Salmonella in high moisture foods. Can. J. Microbiol., 20 : 663, 1974.
38. GABIS, D.A. & SILLIKER, J.H. - ICMSF Method studies VI. The influence of selective enrichment media and incubation temperatures on the detection of Salmonellae in dried foods and feeds. Can. J. Microbiol., 20 : 1509, 1974.
39. GELDRISH, E.E. - Sanitary significance of fecal coliforms in the environment. Washington, Federal Water Pollution Control Administration, 1966. (Publ. wp 20 - 3).
40. GERLACH, E. - Keimnachweis mittels Membranfiltration. Dtsch. milchwirtsch., 33 : 1158 - 59, 1978.
41. GOFF, J.H. et alii - Revival and subsequeute isolation of heat inj bacteria by a membrane filter technique. Appl. Microbiol., 23 : 857 - 62, 1972.

42. GOLTZ, A. - Report 1312. Joint Intelligence Objectives Agency, Washington. 1947. Apud BARBER, F.W. et alii, ref. 10.
43. GRABOW, W.O.K. & PREEZ, M. - Comparison of m-Endo les, Mac Conkey, and Teepol media for membrane filtration counting of total coliform bacteria in water. Appl. environ. Microbiol., 38 : 351 - 58, 1979.
44. GRAVES, D.C. & SCHIPPER, I.A. - Membrane filtration technique for isolating organisms from raw milk of normal udders. Appl. Microbiol., 14 : 535 - 38, 1966.
45. HAAS, G.J. - Use of the membrane filter in the brewing laboratory. Wallerstein Lab. Commun., 19 : 7 - 21, march, 1956.
46. HARGRAVE, R.E. et alii - A seletive medium and presumptive procedure for detecting Salmonella in dairy products. J. Milk Food Technol., 34 : 6 - 11, 1971.
47. HOB DEN, D.A. et alii - A rapid presumptive procedure for the detection of Salmonella in food ingredients. Appl. Microbiol. 25 : 123 - 29, 1973.
48. HSU, S.C. & WILLIAMS, T.J. - Evaluation of factors affecting the membrane filter technique for testing drinking water. Appl. environ. Microbiol., 44 : 453 - 60, 1982.
49. INSALATA, N.F. et alii - A comparison of cultural methods used with microcolony and direct fluorescent antibody technique to detect Salmonellae. J. Milk Food Technol., 38 : 201 - 03 1975.

50. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS
FOR FOODS - Micro-organisms in foods: their significance
and methods of enumeration. 2. ed. Toronto, University
of Toronto Press, 1978. p. 8-11, 15-19, 125-137, 160-171.
51. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR
FOODS - Microbial ecology of foods. New York, Academic
Press, 1980. v. 2, p. 521-24.
52. KABLER, P.W. & CLARK, H.F. - The use of differential media
with the membrane filter. Am. J. public. Health Nat.
Health, 42 : 390 - 92, 1952.
53. KIRKHAM, W.K. & HARTMAN, P.A. - Membrane filter method for the
detection and enumeration of salmonella in egg albumen.
Poult. Sci., 41 : 1082 - 88, 1962.
54. K LAPES, N.A. - Comparison of Vogel - Johnson and Baird - Parker
media for membrane filtration of Staphylococcus in swimming
pool water. Appl. environ. Microbiol., 46 : 1318 - 22,
1983.
55. KONOWALCHUK, J. & SPEIRS, J.I. - An efficient ultrafiltration
method for enterovirus recovery from ground beef. Can. J.
Microbiol., 19 : 1054 - 56, 1973.
56. KOSTENBADER JR., K.D. & CLIVER, D.O.-Polyelectrolyte flocculation
as an aid to recovery of enteroviruses from oysters. Appl.
Microbiol., 24 : 540 - 43, 1972.
57. KOSTENBADER JR., K.D. & CLIVER, D.O. - Filtration methods for
recovering enteroviruses from foods. Appl. Microbiol., 26:
149 - 54, 1973.

58. KOTAKA, P.I. et alii - Surto de toxi-infecção alimentar, ocorrido em Curitiba - Paraná em 1978. Bol. Epidemiol., 11(6): 50 - 53, 1979.
59. KRYSINSKI, E.P. & HEIMSCH, R.C. - Use of enzyme labeled antibodies to detect *Salmonella* in foods. Appl. environ. Microbiol., 33 : 947 - 54, 1977.
60. Le CHEVALLIER, M.W. et alii - New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water. Appl. environ. Microbiol., 45 : 484 - 92, 1983.
61. Le CHEVALLIER, M.W. et alii - Comparison of verification procedures for the membrane filter total coliform technique. Appl. environ. Microbiol., 45 : 1126 - 28, 1983.
62. LEIFSON, E. - New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) bacilli. Am. J. Hyg., 24 : 423 - 32, 1936.
63. LEUSDEN, F.M. et alii - The standard *Salmonella* isolation method. IN : COVRY, J.E.L. et alii, ed. - Isolation and identification methods for food poisoning organisms. London, Academic Press, 1982.
64. LINEAVER, H. et alii - Heat stability of egg white protein under minimal conditions that kill *Salmonellae*. Albany, Agricultural Research Service, 1967. (ARS 74 - 39)
65. LITCHFIELD, J.H. - *Salmonella* and food industry. Methods for isolation, identification and enumeration. Crit. Rev. Food Technol., 3 : 415 - 56, 1973.

66. LUNDBECK, H. et alii - The swedish Salmonella outbreak of 1953. J. appl. Bacteriol., 18 : 535, 1955.
67. MC CULLOUGH, N.B. & EISELE, C. W. - Experimental human salmonellosis. I. Pathogenicity of strains of Salmonella meleagridis and Salmonella anatum obtained from spray-dried whole egg. J. infect. Dis., 88 : 278 - 89, 1951.
68. MC CULLOUGH N.B. & EISELE, C.W. - Experimental human salmonellosis. IV. Pathogenicity of strains of Salmonella pullorum obtained from spray-dried whole egg. J. infect. Dis., 89 : 259 - 65, 1981.
69. MAYOU, J. - MPN - Most probable number. In : SPECK, M.L., ed. - Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed. Washington, American Public Health Association, 1980. p. 277 - 98
70. MEHLMAN, I.J. et alii - Methodology for enteropathogenic Escherichia coli. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 58 : 283 - 85, 1975.
71. MILLIPORE CORP. Belford. Microbiological analysis of beverage Belford, 1973. (Catalogn . AB601/V)
72. MINNICH, S.A. et alii - Enzyme immunoassay for detection of Salmonellae in foods. Appl. environ. Microbiol., 43 : 877 - 83, 1982.
73. MOHR, H.K. et alii - Comparison of fluorescent - antibody methods and enrichment serology for the detection of Salmonel. Appl. Microbiol., 27 : 324 - 28, 1974

74. MORGAN - JONES, S. C. - A method for enumerating *Salmonellas* from environments in the poultry industry. IN : COVRY, J. E. et alii, ed. - Isolation and identification methods for food poisoning organisms. London, Academic Press, 1982. p. 78.
75. MOSSEL, D.A.A. & VINCENTIE, H.M. - Ecological studies on the enrichment of enterobacteriaceae occurring in dried foods in some currently used media. IN : INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD MICROBIOLOGY "MICROBIOLOGY OF DRIED FOODS", 6, Bilthoven, The Netherlands, 1969 - Proceedings. Bilthoven, IAMS, 1969. p. 135.
76. MUNSON, T.E. et alii - Evaluation of an automated fluorescent antibody procedure for detection of *Salmonella* in foods and feeds. Appl. environ. Microbiol., 31 : 514 - 21, 1976.
77. NEVES FILHO, L.C. et alii - Processamento e congelamento de ovos. Rev. Frio, Campinas, dez. 1973.
78. NOORDAN, D. - Identification of plant viruses; methods and experiments. Wageningen Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1973.
79. NORTHROP, J.H. - Pepsin activity units and methods for determining peptic activity. J. gen. Physiol., 16 : 41 - 58, 1932.
80. NOVO INDUSTRI A/S. Dinamarca - Alcalase. Bags vaerd, Dina marca, 1977.

81. PAGEL, J.E. et alii - Comparison of four membrane filter methods for fecal coliform enumeration. Appl. environ. Microbiol., 43 : 787 - 93, 1982.
82. PARKINSON, T.L. - The chemical composition of egg. J. Sci. Food Agric., 17 : 101 - 11, 1966.
83. PATON, A.M. & JONES, S.M. - The observation and enumeration of micro-organisms in fluids using membrane filtration and incident fluorescence microscopy. J. appl. Bacteriol., 38: 199 - 200, 1975.
84. PETERKIN, P.I. & SHARPE, A.N. - Membrane filtration of dairy products for microbiological analysis. Appl. environ. Microbiol., 39 : 1138 - 43, 1980.
85. PETERKIN, P.I. et alii - Inexpensive treatment of frozen dairy products for membrane filtration. Appl. environ. Microbiol., 43 : 486 - 87, 1982.
86. PRESSWOOD, W.G. & BROWN, L.R. - Comparison of Gelman and Millipore membrane filters for enumerating fecal coliform bacteria. Appl. Microbiol., 25 : 332 - 36, 1973.
87. RAY, B. et alii - Isolation of Salmonellae from naturally contaminated dried milk products. III. Influence of pre-enrichment conditions. J. Milk Food Technol., 35 : 607 - 14, 1972.
88. REASONER, D.J. et alii - Rapid seven-hour fecal coliform test. Appl. environ. Microbiol., 38 : 229 - 36, 1979.

89. ROMANOFF, A.L. & ROMANOFF, A., ed. The avian egg 2.ed. New York, John Wiley, 1963, p. 311 - 539.
90. SÃO PAULO. LEIS, DECRETOS, etc. - Decreto nº 12468 de 30 de outubro de 1978 - Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. Diário Oficial do Estado de São Paulo, 21 out. 1978.
91. SHARPE, A.N. & MICHAUD, G.L. - Hydrophobic grid-membrane filters: new approach to microbiological enumeration. Appl. Microbiol., 28 : 223 - 25, 1974.
92. SHARPE, A.N. & MICHAUD, C.L. - Enumeration of high numbers of bacteria using hydrophobic grid-membrane filters. Appl. Microbiol., 30 : 519 - 24, 1975.
93. SHARPE, A.N. et alii - Membrane filtration of food suspensions. Appl. environ. Microbiol., 37 : 21 - 35, 1979.
94. SHARPE, A.N. et alii - Improved detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods by a membrane filter method. Appl. environ. Microbiol., 38 : 431 - 35, 1979.
95. SHARPE, A.N. et alii - Detection of *Escherichia coli* in foods: indole staining methods for cellulosic and polysulfone membrane filters. Appl. environ. Microbiol., 41 : 1310 - 15, 1981.
96. SILLIKER, J.H. et alii - The fluorescent antibody technique as a mean of detecting *Salmonellae* in foods. J. Food Sci., 31 : 240 - 44, 1966.

97. SILLIKER, J.H. et alii - ICMSF methods studies. XI.
Collaborative/comparative studies on determination of
coliforms using the most probable number procedure. J. Food
Protect, 42 : 638 - 44, 1979.
98. SPERBER, W.H. & DEIBEL, R.H. - Accelerated procedure for Salmo
nella detection in dried foods and feeds involving only
broth culture and serological reactions. Appl. Microbiol.,
17 : 533 - 39, 1969.
99. SPRINZ, H. et alii - Histopatology of the upper small intestines
in typhoid fever: biopsy of experimental disease in men.
Am. J. digest. Dis., 11 : 615 - 24, 1966.
100. STEWART, B.J. et alii - Rapid radiometric method for detection
of Salmonella in foods. Appl. environ. Microbiol., 40 :
223 - 30, 1980.
101. SULLIVAN, R. et alii - Method for isolating viruses from ground
beef. J. Food Sci., 35 : 624 - 26, 1970.
102. TAKEUCHI, A. & SPRINZ, H. - Electron microscope studies of
experimental Salmonella infection in the preconditioned
guinea pig. II. Response of the intestinal mucosa to the
invasion by Salmonella typhimurium. Am. J. Pathol., 51 :
137 - 61, 1967.
103. TATCHER, F.S. & CLARCK, D.S., ed. - Microorganisms in foods:
Their significance and methods of enumeration. Toronto,
University of Toronto Press. 1980. v. 1, p. 56 - 82.

104. THOMASON, B.M. & HEBERT, G.A. - Evaluation of commercial conjugates for fluorescent antibody detection of Salmonellae. Appl. Microbiol., 27 : 862 - 69, 1975.
105. TIERNEY, J.T. et alii - Comparison of methods for the recovery of virus inoculated into ground beef. Appl. Microbiol., 26 : 497 - 501, 1973.
106. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Salmonella surveillance. Wkly. Epidemiol. Rec., 48 : 80, 1973.
107. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Transferable central resistance in Salmonella in South and Central American. Wkly Epidemiol. Rec., 49 : 65, 1973.
108. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Gastroenteritidis from cheese. Wkly. Epidemiol Rec., 49 : 200, 1974.
109. YOKOYA, F. - Métodos e técnicas em microbiologia de alimentos. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1978. p. 189 - 208.

RESUMO

Dentro da linha de pesquisa de identificação e e numeração rápida de microrganismos, o presente trabalho foi rea lizado no sentido de verificar a viabilidade do emprego da membra na filtrante na recuperação de *Escherichia coli* e *Salmonella ty* phimurium, inoculadas experimentalmente em ovo de galinha (clara, gema e ovo líquido).

Após o tratamento com a protease bacteriana "Al calase", viabilizou-se a filtragem de 5,0 g de clara, 2,5 g de o vo líquido e 1,0 g de gema, através da membrana HAWG 47 mm da mar ca Millipore.

A recuperação de *E. coli* em clara foi realizada através do emprego simultâneo da técnica de plaqueamento em pro fundidade e de um método por nós desenvolvido, utilizando a mem brana filtrante. Os resultados obtidos com a técnica do plaquea mento foram próximos aos conseguidos com a técnica proposta. Co locando os dois resultados em gráfico, foi obtida uma reta de re gressão com coeficiente de correlação de 0,95 e coeficiente an gular de 0,99. Os resultados da experiência de inoculação de ovo líquido com *E. coli*, obtidos com o emprego das duas técnicas, for neceram uma reta com coeficiente de correlação de 0,98. O coefi ciente angular foi baixo, 0,39 havendo necessidade da introdu ção de um fator de correção multiplicativo de 2,6, para compen sar a menor recuperação obtida com o uso da técnica da membrana filtrante. O isolamento de *E. coli* da gema foi insatisfatório, com o emprego da técnica da membrana filtrante.

A *S. typhimurium*, previamente inoculada em clara e em ovo líquido, foi recuperada com o emprego da técnica clássi

ca de enriquecimento e isolamento em meios seletivos e com o método por nós desenvolvido. Os resultados demonstraram que mesmo em concentrações tão baixas como 0,3 microrganismo por grama de clara, é possível recuperar a *S. typhimurium* através da técnica da membrana filtrante. A recuperação deste microrganismo do ovo líquido foi insatisfatória.

ABSTRACT

In the line of research for the identification and rapid enumeration of micro-organisms, the present work was carried out with the object of verifying the viability of the use of a membrane filter in the recuperation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, inoculated experimentally into the hen's egg (white, yolk, and whole liquid egg).

After treatment with bacterian protease "Alcalase", 5.0 g of egg white, 2.5 g of whole liquid egg, and 1.0 g of egg yolk were filtered through the 47 mm HAWG filter (Millipore).

The recuperation of *E. coli* from the egg white was done by means of the simultaneous use of pour plate method and a method developed by us, using a membrane filter. The results obtained using the pour plate technique were very similar to those developed by the authors of this research. When both results were plotted on a graph, a line of regression with a correlation coefficient of 0.95 and an angular coefficient of 0.99 was obtained. The results of the experiment involving the inoculation of the whole liquid egg with *E. coli*, using both techniques, showed a line with a correlation coefficient of 0.98. The angular coefficient of 0.39 was low, making the introduction of a manipulative correction factor of 2.6 necessary in order to compensate for a lesser recuperation obtained using the membrane filter technique. The isolation of *E. coli* from the yolk was not satisfactory using the membrane filter technique.

The *S. typhimurium*, previously inoculated into white and whole liquid egg, was recuperated using the classic

technique of enrichment and isolation in selective media and also by methods developed by us. The results show that even in concentrations as low as 0.3 micro-organisms per gram of egg white, it is possible to recuperate the *S. typhimurium* by use of the membrane filter technique. The recuperation of this microorganism from the whole liquid egg was unsatisfactory.

APÊNDICE

Os meios de cultura e os reagentes abaixo descritos foram preparados em nosso laboratório, em função da dificuldade em obtê-los comercialmente. São eles:

1. Reagentes para teste de urease.

Uréia	20,0 g
Azul de Bromotimol	0,16g
Vermelho de Fenol	0,20g
Água destilada	100 ml

Segundo Klaber e Clark⁵²

2. Caldo m Tetracionato base.

Proteose Peptona	5,0 g
Sal biliar	1,0 g
Tiossulfato de Sódio	30,0 g
Água destilada	1000ml

Segundo Klaber e Clark⁵²

3. Caldo m Verde Brilhante.

Proteose peptona nº 3	20,0 g
Extrato de levedura	6,0 g
Lactose	20,0 g
Sacarose	20,0 g
Cloreto de Sódio	10,0 g
Vermelho de Fenol	0,16g
Verde Brilhante	0,025g
Água destilada	1000 ml

Segundo Klaber e Clark⁵²

O meio m Verde Brilhante teve seu pH corrigido para 7,5 com hidróxido de sódio, sendo, em seguida, autoclavado a 121° C por 15 min. O pH do meio m Tetrionato base foi elevado a 8,4 com hidróxido de sódio, após o que o caldo foi aquecido até a fervura. A oxidação do tiossulfato a tetrionato, no caldo m Tetrionato base, foi realizada cerca de 10 min antes do uso do meio de cultura, mediante a introdução de 0,2 ml de solução de iodo a 30% para cada 10,0 ml de caldo.