



MARIANA DOS SANTOS MARTIMIANO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO A BASE DE
SORO DE QUEIJO E PÚRPURA DE BROMOCRESOL PARA DETERMINAÇÃO
DE COLIFORMES TOTAIS**

**INCONFIDENTES - MG
2018**

MARIANA DOS SANTOS MARTIMIANO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO A BASE DE
SORO DE QUEIJO E PÚRPURA DE BROMOCRESOL PARA DETERMINAÇÃO
DE COLIFORMES TOTAIS**

Projeto Final de Curso apresentado como pré-requisito de conclusão do curso de Engenharia de alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais Campus Inconfidentes para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: MSc. Taciano B. Fernandes

**INCONFIDENTES - MG
2018**

MARIANA DOS SANTOS MARTIMIANO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO A
BASE DE SORO DE QUEIJO E PÚRPURA DE BROMOCRESOL PARA
DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS**

Data da aprovação: ____ de _____ de 20__

Orientador: MSc.Taciano B. Fernandes
IFSULDEMINAS - *Campus Inconfidentes*

Dr^a: Ana Cristina Ferreira Moreira da Silva
IFSULDEMINAS - *Campus Inconfidentes*

Dr^a: Mariana Borges de Lima Dutra
IFSULDEMINAS - *Campus Inconfidentes*

INCONFIDENTES – MG
2018

DEDICATÓRIA

*Aos meus avós Maria e Moacir por
todo amor e incentivo. Dedico!*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais Neusa e Antônio, incentivo, apoio e amor incondicional.

Ao Alex meu amigo e namorado por toda paciência, compreensão, amor, carinho e apoio nesta jornada.

Aos meus familiares que de alguma forma me incentivaram, em especial meu primo Vinicius Cesário que mesmo longe se faz presente sempre.

Ao IF Sul de Minas- Campus Inconfidentes por ter me recebido de braços abertos durante todos esses anos de ensino médio e superior.

Ao Taciano Fernandes meu orientador e amigo pela confiança, sabedoria, palavras de incentivo e suporte para a realização deste trabalho á você minha eterna gratidão.

Á todos os professores que me acompanharam nessa jornada que não só contribuíram para a minha formação profissional, mas também para a formação pessoal aos mestres minha enorme admiração e carinho.

Aos servidores e técnicos que estão e passaram durante esses anos de IF Sul de Minas.

A minha amiga de toda uma vida Guadalupe Costa por todas as horas de estudos e pela amizade que levamos desde o primário dentro e fora das salas de aula.

As minhas amigas desde o técnico Angélica, Fernanda e Guadalupe por todo incentivo que apesar dos imprevistos sempre estamos juntas.

As minhas amigas Michele e Silmara por todos os momentos que passamos juntas, pelas festas e pelo apoio nessa reta final, a vocês tudo de melhor sempre.

A minha turma da Engenharia de Alimentos em especial ao Abdiel, Ana Cristina, Agatha, Estelinha, Guadalupe, Michele e Silmara.

Poderia citar cada uma das pessoas que passaram por minha vida nessa etapa, uns agora mais distantes e outros mais próximos, porém todos com a mesma importância, á todos os meus amigos o meu muito OBRIGADA!

EPÍGRAFE

“Enquanto a cor da pele for mais importante que o brilho dos olhos haverá guerra”.

Robert N. Marley

“Tudo Passa...”.

Chico Xavier

RESUMO

O soro de queijo é um resíduo altamente poluente e extremamente nutritivo. Sua composição é praticamente água, lactose e vitaminas esses nutrientes são utilizados para outros fins na indústria de alimentos, porém, apenas 50% desse resíduo é utilizado sendo grande parte descartado. O soro pode ser classificado ácido e doce, e essa diferença é obtida pelo método de processamento. Os meios de enriquecimento fornecem os nutrientes necessários para o crescimento de um determinado microrganismo podendo inibir outros. A púrpura de bromocresol é um corante que em meio ácido torna-se amarelo e em meio básico púrpura, essa reação acontece devido à fermentação da lactose presente no meio e a produção de ácido láctico. Para a determinação de coliformes totais usa-se a técnica dos tubos múltiplos para se obter o Número Mais Provável de coliformes por 100 ml de amostra. Para o teste presuntivo usa-se o caldo lactose como fonte enriquecida de lactose. Esta é uma análise quantitativa feita em tubos de ensaio que se baseia em duas etapas a presuntiva e a confirmativa. O caldo de enriquecimento elaborado com soro de queijo e púrpura de bromocresol, para determinar o Número Mais Provável de coliforme totais na fase presuntiva do teste de tubos múltiplos, foi elaborado com 50% de água destilada e 50% de soro de queijo e 1 ml do indicador de cor púrpura de bromocresol. Os resultados mostraram-se promissores para a substituição do caldo lactose por soro de queijo através da mudança de coloração o que possibilitou a confirmação da presença de coliformes totais em 100% das amostras analisadas, ao ser comparado com o caldo verde brilhante bile 2% de lactose de acordo com os resultados expressos na tabela do NMP, o que possibilita a abertura de novos estudos e o reaproveitamento com o soro de queijo que ainda é considerado um subproduto.

Palavras- chaves: Enumeração. Reaproveitamento. Coliformes. Microrganismos.

ABSTRACT

Cheese whey is a highly polluting and extremely nutritious waste. Its composition is virtually water, lactose and vitamins these nutrients are used for other purposes in the food industry, however, only 50% of that residue is used being largely discarded. The serum can be classified as acid and sweet, and this difference is obtained by the processing method. Enrichment media provide the nutrients necessary for the growth of a given microorganism and may inhibit others. Bromocresol purpura is a dye that in acidic medium turns yellow and in purple basic medium, this reaction happens due to the fermentation of lactose present in the medium and the production of lactic acid. For the determination of total coliforms the multiple tube technique is used to obtain the Most Likely Number of coliforms per 100 ml sample. For the presumptive test the lactose broth is used as enriched source of lactose. This is a quantitative analysis done on test tubes that is based on two steps the presumptive and the confirmatory. The enrichment broth made with cheese serum and bromocresol purple to determine the most likely total coliform number in the presumptive phase of the multiple tube test was prepared with 50% distilled water and 50% cheese serum and 1 ml of the bromocresol purple color indicator. The results were promising for the replacement of the lactose broth by cheese serum by the color change, which allowed the confirmation of the presence of total coliforms in 100% of the analyzed samples when compared to the bright green broth bile 2% of lactose according to the results expressed in the NMP table, which makes it possible to open new studies and reuse with whey that is still considered a by-product.

Keywords: Enumeration. Reuse. Coliforms. Microorganisms.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
EPIÍGRAFE	vii
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. JUSTIFICATIVA	3
1.2. OBJETIVO GERAL	3
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM ALIMENTOS	4
2.2 MEIOS DE CULTURA E SUAS CARACTERÍSTICAS	4
2.3 INDICADORES ÁCIDO-BASE	5
2.4 CARACTERÍSTICAS DO SORO DE QUEIJO	5
2.5 CARACTERÍSTICAS DOS COLIFORMES TOTAIS.....	7
2.6 TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS	7
3. METODOLOGIA	9
3.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....	9
3.2. PREPARO DA SOLUÇÃO ALCOÓLICA DE PÚRPURA DE BROMOCRESOL.....	9
3.3 FORMULAÇÃO DO CALDO SORO DE QUEIJO PÚRPURA DE BROMOCRESOL	9
3.4 PREPARO DO CALDO VERDE BRILHANTE BILE 2% LACTOSE.....	11
4. ANÁLISE DOS DADOS	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	13
5.1 APLICAÇÃO DOS DOIS CALDOS EM QUEIJO MINAS FRESCAL	13
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	15
7. CONCLUSÕES	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: (a) caldo soro de queijo e (b) púrpura de bromocresol.....	10
Fonte: elaboração própria.....	10
Figura 02: Caldo soro de queijo após adição de 1 ml de solução de púrpura de bromocresol. Fonte: elaboração própria.	10
Figura 03: Caldos sem inoculação de amostra (a) Técnica dos tubos múltiplos utilizando caldo soro de queijo púrpura de bromocresol e (b) técnica dos tubos múltiplos utilizando caldo verde brilhante. Fonte: elaboração própria.	11
Figura 04: (a) Técnica dos Tubos Múltiplos Número Mais Provável para coliformes totais, caldo verde brilhante e (b) Técnica dos Tubos Múltiplos Número Mais Provável para coliformes totais, caldo soro de queijo púrpura de bromocresol. Fonte: elaboração própria.	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Resultados da contagem do Número Mais Provável por grama de amostra. Análise utilizando caldo verde brilhante bile 2% e caldo soro de queijo púrpura de bromocresol para amostra de queijo frescal.....	14
---	-----------

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países que mais produz leite e parte destina-se à fabricação de queijos que gera como subproduto o soro de queijo rico em aminoácidos essenciais, sendo assim um resíduo altamente poluente. O Soro de queijo é um produto lácteo líquido obtido durante o processamento de queijo mediante a separação da coalhada após a coagulação do leite. Neste processo o soro pode se classificar de duas formas o soro ácido, no qual a coagulação se faz por acidificação e deve apresentar pH inferior a 6,4 e o soro doce no qual a coagulação ocorre por ação enzimática apresentando pH de 6,8 (GOMES et al, 2014).

As indústrias alimentícias vêm utilizando este resíduo como matéria prima na elaboração de bebidas lácteas e outras tecnologias para a obtenção de novos produtos ou específicos da indústria de alimentos. Para a utilização do soro é necessário a determinação da sua qualidade microbiológica e físico- química que indicará o processamento mais adequado e quais produtos podem resultar do reuso desse resíduo (TEIXEIRA; FONSECA, 2008).

Os microrganismos indicadores quando presentes nos alimentos informa a ocorrência de contaminação, um exemplo desses microrganismos são os coliformes (totais ou termotolerantes) e *Escherichia coli* que, quando presentes em alimentos processados podem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processo de sanitização, fabricação e armazenamento (SOUSA, 2006).

Os coliformes podem ser facilmente destruídos pela ação do calor, porém sua contagem é extremamente necessária para averiguar se houve contaminação do alimento durante o processamento.

Para a determinação de coliformes é utilizada a técnica dos tubos múltiplos que quantifica o “Número Mais Provável” (NMP) de microrganismos. Esta técnica consiste em duas etapas a presuntiva e a confirmativa sendo esta última realizada apenas se houver crescimento positivo de coliformes totais na primeira etapa, o que é percebido pela mudança de cor

(coloração amarela) devido à reação ácida e/ou produção de gás no fundo do tubo (FONTES, 2013).

Para observar a mudança de coloração na fase presuntiva usa-se um indicador de cor para afirmar o crescimento bacteriano, como por exemplo, o púrpura de bromocresol que, na presença do microrganismo ocorre a redução o pH do meio e sua coloração vai de púrpura, azul violácea, para amarelo e pode ser utilizado em vários meios seletivos de acordo com o microrganismo a ser detectado (CUCHINSKI; CAETANO; DRAGUNSKI, 2010).

1.1. JUSTIFICATIVA

O soro de queijo quando descartado na natureza é altamente poluente devido a sua vasta quantidade de nutrientes por este motivo vem surgindo outros meios de sua utilização como em bebidas lácteas, indústria farmacêutica e até mesmo na área microbiológica, já que este resíduo possui características favoráveis para o crescimento de microrganismos.

Os coliformes totais são indicadores de má sanitização no processo industrial, por isso é necessário a utilização de testes para verificar as condições do produto final, sendo a técnica de tubos múltiplos mais utilizada para essa ocasião por ser de fácil manuseio e rápida.

O soro de queijo por ser rico em lactose e torna-se favorável para o desenvolvimento de microrganismo.

1.2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um caldo de enriquecimento à base de soro de queijo com púrpura de bromocresol para a identificação presuntiva e confirmativa de coliformes totais.

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver caldo de enriquecimento à base de soro de queijo e púrpura de bromocresol.
- Aplicar a técnica dos tubos múltiplos substituindo o caldo lactose por caldo soro de queijo púrpura de bromocresol em teste presuntivo e confirmativo.
- Comparar os resultados da técnica dos tubos múltiplos utilizando caldo soro de queijo púrpura de bromocresol com a técnica dos tubos múltiplos convencional para identificação de coliformes totais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM ALIMENTOS

A análise microbiológica em alimentos é realizada para avaliar suas características e confirmação de que esse produto não forneça risco ao consumidor principalmente quando os princípios de sanitização e boas práticas de fabricação são violados além de avaliar o tempo de sua vida de prateleira e condições de armazenamento. A análise também é realizada para verificar as especificações desejadas quando se trata de um alimento a ser importado ou exportado. Na maioria das indústrias não tem um laboratório específico para realizar essas análises devido a quantidade de materiais desejados e o tempo de espera também, por isso tem optado por análises com resultados mais objetivos de resultados como positivo ou negativo. O método a ser empregado varia de acordo com o alimento a ser analisado ou do tipo de microrganismo a ser estudado (SILVA, 2002).

2.2 MEIOS DE CULTURA E SUAS CARACTERÍSTICAS

Meios de cultura são preparos que contêm os nutrientes essenciais para favorecer o crescimento de microrganismos e podem ser sólidos, líquidos (Caldos) ou semi- sólidos (LINARD, 2013).

Os meios de cultura sólidos contêm um substância solidificadora que permite a formação de colônias devido a superfície endurecida, os meios líquidos ou caldos não possuem agente solidificante, os nutrientes são dissolvidos em solução aquosa e isso aumenta significamente o número de microrganismo do que em meios sólidos e os meios semi- sólidos (KAYSER, 2012).

O meio deve ser esterilizado corretamente para que ausente qualquer tipo de contaminante que possa interferir no crescimento do microrganismo, deve também ter cuidado com a quantidade de nutriente para que essa não cause inibição do mesmo (LINARD, 2013).

Os meios podem ser classificados de acordo com o objetivo funcional, como os meios de enriquecimento, que favorecem os nutrientes necessários para o crescimento de um microrganismo inibindo seus competidores, os meios seletivos que contém substâncias que inibem o crescimento de um determinado grupo de microrganismo e favorecem o crescimento de outros; e os meios indicadores que funcionam a base de mudança do pH ocorre uma alteração da cor do meio que evidencia a presença do microrganismo. Os meios de cultura também se classificam como sintéticos ou químicos e naturais que são utilizados para microrganismos menos exigentes e podem ser extraídos de plantas, animais e outros meios que possuem os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos microrganismos (LINARD, 2013).

2.3 INDICADORES ÁCIDO-BASE

Agentes indicadores são substâncias capazes de alterar a cor do meio dependendo das condições em que estão contidas. Os indicadores ácidos- base, conhecidos também como indicadores de pH são compostos orgânicos fracamente ácidos (indicador ácido) ou fracamente básico (indicador básico) a mudança de coloração em uma estrita faixa de pH (CUCHINSKI; CAETANO; DRAGUNSKI, 2010).

O púrpura de bromocresol $C_{21}H_{16}Br_2O_5S$ é um corante indicador de cor que em meio ácido torna-se amarelo e em meio básico sua coloração é púrpura, a reação acontece pois microrganismos presentes no meio que fermentam a lactose fazendo com que o meio fique ácido e a coloração amarela com ou sem produção de gás (ACUMEDIA, 2010).

2.4 CARACTERÍSTICAS DO SORO DE QUEIJO

Segundo a Instrução Normativa nº 62/2011 (BRASIL, 1996) Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda. O leite bovino é constituído em sua maior parte de água seguido de sólidos totais como proteínas, gorduras, lactose e minerais.

O Brasil é o quinto maior produtor internacional de leite perdendo apenas para a Índia, Estados Unidos, China e Paquistão (JÚNIOR; JUNG, 2017). Parte desta produção se destina a produtos lácteos como, por exemplo, a fabricação de queijos que de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996), é o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Ou seja a produção de queijos gera um resíduo, o soro de queijo, que representa, aproximadamente 85% do volume de leite utilizado para a fabricação de queijo, e um resíduo altamente poluente devido a sua alta demanda biológica de oxigênio (DBO) (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001). O soro de queijo é rico em nutrientes e é constituído praticamente de água, lactose, proteínas, gorduras, sais minerais e vitaminas além de alguns ácidos como o láctico e o cítrico. Esses nutrientes presentes no soro são de grande importância para a indústria alimentícia como na fabricação de bebidas lácteas ou enriquecimento de outros produtos.

O soro é classificado em doce ou ácido, dependendo do seu método de processamento. O soro doce é resultante da coagulação enzimática do leite devido à adição de enzimas de origem microbianas, vegetais ou animais. A mais utilizada para a fabricação de queijos é a enzima renina, de origem animal, e seu pH varia de 6,2 a 6,4. O Outro tipo de soro é o ácido que é obtido através da coagulação ácida do leite realizado pela adição de ácidos (ácido láctico, acético ou cítrico) com pH de 6,8. O mais utilizado em alimentos é o soro doce por apresentar a maior quantidade de nutrientes e lactose disponíveis (NUNES; SANTOS, 2015).

O soro não aproveitado pela indústria deve ser descartado de forma correta e é estabelecido pela legislação ambiental o descarte do soro de forma direta ou indireta nos rios. Segundo a lei federal nº 9605 de 13 de fevereiro de 1998 (BRASIL, 1998), os laticínios devem, obrigatoriamente, tratar seus efluentes industriais antes do descarte final.

No Brasil apenas 50% da produção de soro é utilizada causando o desperdício, perdas financeiras e impacto ambiental pela elevada carga de nutrientes presentes no soro. E na Europa e América do Norte utiliza cerca de 95% do soro na indústria de alimentos sendo a maior parte utilizado para enriquecimento na alimentação animal. Devido à sua composição

nutricional o seu tratamento é de alto custo para ser descartado como efluente, por isso é necessário o desenvolvimento de tecnologias adequadas para o aproveitamento do soro nas indústrias como matéria prima, pois ao mesmo tempo que se desenvolve um novo produto ou enriquecimento de produtos já existentes gera-se ganhos e minimiza-se os danos ambientais pelo descarte incorreto, a maior parte do soro tem sido utilizada na forma líquida para o desenvolvimento de novos produtos. O preparo de bebidas de soro é um dos métodos mais eficientes de aproveitá-lo, como o uso em bebidas funcionais, lácteas e fermentadas, sucos vitaminados ou em produtos lácteos, por exemplo, ricota, requeijão, sorvetes e sobremesas como doce de leite pastoso. Ele também é muito usado na panificação para produção de biscoitos, bolos e pães (CARDOSO, 2014).

A composição do soro de queijo permite que este seja utilizado como meio de cultura já que o mesmo é um substrato de fermentação onde os microrganismos são capazes de assimilar a lactose como fonte básica de carbono e energia ao utilizar a lactose é produzido o ácido láctico.

2.5 CARACTERÍSTICAS DOS COLIFORMES TOTAIS

O grupo dos coliformes totais é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae* que são capazes de fermentar a lactose e produzir gás, quando incubadas a 35- 37°C, por 48 horas. São bacilos gram- negativos, não formam esporos são aeróbios ou aeróbios facultativo. As bactérias pertencentes ao gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* fazem parte predominantemente deste grupo. Destes, apenas a *Echerichia coli* tem como habitat primário o trato gastro- intestinal do homem e certos animais. Os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como na vegetação e no solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal como *Samonella* e *Shigella*. A presença de coliformes totais em alimentos representa indicio de contaminação que pode ser o manipulador, o utensílio e até mesmo a matéria prima. Quando confirmada a contaminação em análise realiza-se uma nova sanitização no local e descarte correto dos produtos contaminados (FERREIRA; LIMA; COELHO, 2014).

2.6 TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS

As análises microbiológicas em água ou alimentos são feitas para investigar a presença ou ausência de microrganismos neste produto, para identificar e quantificar as diversas

espécies microbianas e para isso inúmeros métodos laboratoriais de análise podem ser realizados e esses métodos são divididos em métodos convencionais e métodos rápidos. O método convencional é o mais antigo e vem sendo empregado como método oficial na maioria dos laboratórios, esse método é baseado na capacidade de determinado microrganismo realizar determinadas reações bioquímicas, que normalmente são feitas em tubos de ensaio e podem apresentar um custo elevado devido aos materiais utilizados (GREGHI, 2005).

A técnica dos tubos múltiplos conhecida também como Número Mais Provável (NMP) é uma análise quantitativa que se baseia na distribuição de alíquotas em série de tubos contendo meio de cultura específico para o microrganismo alvo, nesses tubos também haverá um tubo menor conhecido como tubo de Durhan. A contagem é realizada em duas etapas a primeira é a fase presuntiva que permite um enriquecimento seletivo dos coliformes. A confirmação da eficiência dessa fase é a presença de gás no interior do tubo de Durhan. A segunda fase é a confirmativa, a confirmação de coliformes totais, na qual utiliza-se um meio específico e a lactose produzindo a fermentação e a diminuição do pH que será comprovado pela mudança de cor do indicador e a produção de gás no interior do tubo (MARQUEZI, 2010).

3. METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

O soro de queijo foi obtido no laticínio do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Inconfidentes.

A pesquisa foi realizada em quatro etapas mencionadas a seguir:

1. Preparo da solução alcoólica de púrpura de bromocresol.
2. Preparo do caldo soro de queijo púrpura de bromocresol.
3. Preparo do caldo verde brilhante bile 2% lactose.
4. Aplicação dos dois caldos em queijo minas frescal.

3.2. PREPARO DA SOLUÇÃO ALCOÓLICA DE PÚRPURA DE BROMOCRESOL

Para o preparo da solução alcoólica de púrpura de bromocresol foi utilizada a metodologia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2018).

Aqueceu-se 0,1 g de púrpura de bromocresol com 5 ml de etanol a 90% ate completa dissolução. Adicionou-se 3,7 ml de hidróxido de sódio 0,05 M e etanol 20% para completar volume de 250 ml.

3.3 FORMULAÇÃO DO CALDO SORO DE QUEIJO PÚRPURA DE BROMOCRESOL

A segunda etapa consistiu na medição de 150 ml de soro de queijo e posterior mistura em 150 ml de água destilada. Em um total de 27 tubos de ensaio foram distribuídos 9 ml desta mistura, sem a presença de tubos de Durhan pois como sua coloração é púrpura não é possível visualizar o tubo de Durhan. Logo, em seguida, foram autoclavados a 121° por 20 minutos. Figura 01.

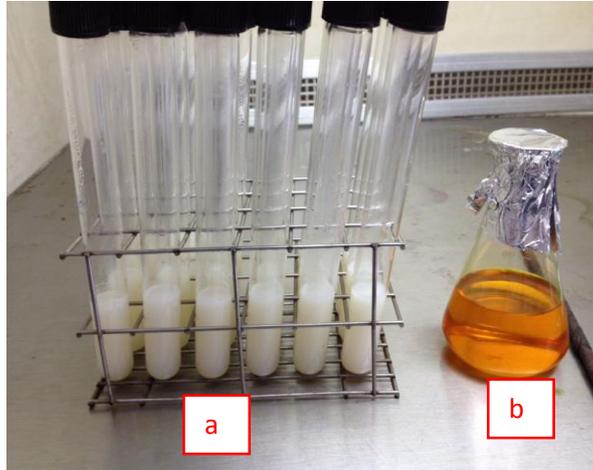


Figura 01: (a) caldo soro de queijo e (b) púrpura de bromocresol. Fonte: elaboração própria.

Após a esterilização, os tubos contendo caldo soro de queijo foram encaminhados para a capela de fluxo laminar com a lâmpada germicida ligada, onde permaneceram por, aproximadamente quinze minutos para esterilização superficial e esfriamento.

Passados os quinze minutos, com uma pipeta de 1 ml esterilizada a 200°C por duas horas, adicionou-se 1 ml de solução de púrpura de bromocresol em cada um dos tubos de ensaio contendo caldo soro de queijo. Figura 2.



Figura 02: Caldo soro de queijo após adição de 1 ml de solução de púrpura de bromocresol. Fonte: elaboração própria.

3.4 PREPARO DO CALDO VERDE BRILHANTE BILE 2% LACTOSE

Para o preparo do caldo verde brilhante bile 2% lactose seguiu-se a recomendação do fabricante. A marca utilizada foi da fabricante TM Media. Foi preparada 300 ml de caldo verde brilhante bile 2% lactose e procedeu-se à distribuição em 27 tubos de ensaio contendo tubos de Durhan em posição invertida e foram encaminhados para esterilização a 121° por 20 minutos.

3.5 APLICAÇÃO DOS DOIS CALDOS EM QUEIJO MINAS FRESCAL

Com a finalidade de confirmar a possível substituição do caldo verde brilhante bile 2% lactose por soro de queijo com púrpura de bromocresol em teste para coliformes totais, foi realizada uma análise com queijo minas frescal, produzido no próprio Campus Inconfidentes. Seguiu-se a mesma metodologia para ambos os testes e as mesmas diluições, por se tratar de amostra sólida. Figura 4.

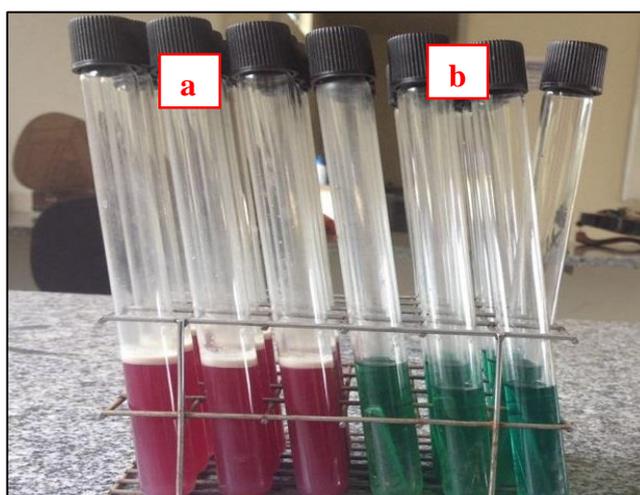


Figura 03: Caldos sem inoculação de amostra (a) Técnica dos tubos múltiplos utilizando caldo soro de queijo púrpura de bromocresol e (b) técnica dos tubos múltiplos utilizando caldo verde brilhante. Fonte: elaboração própria.

4. ANÁLISE DOS DADOS

A confirmação da presença de coliformes totais foi realizada mediante leitura em tabela específica para as diluições mencionadas. Foram considerados positivos os tubos que foram incubados em um período de 24 a 48 horas em 35° C e apresentaram fermentação com presença de gás nos tubos de Durhan, no teste utilizando caldo verde brilhante, e a mudança da coloração de azul violácea para tom alaranjado/amarelo para o teste com o caldo soro de queijo púrpura de bromocresol. Foi utilizada a tabela do Número Mais Provável da Instrução Normativa 62 de 26 de Agosto de 2003.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 APLICAÇÃO DOS DOIS CALDOS EM QUEIJO MINAS FRESCAL

Após o preparo dos dois caldos, ambos foram aplicados na amostra hermeticamente fechada de queijo minas frescal. Os resultados das análises podem ser verificados na Tabela 01.

Analisando a Figura 04 pode-se verificar a mudança da coloração de azul violácea, no teste com caldo soro de queijo púrpura de bromocresol, para amarelo, o que indica a presença de coliformes totais na amostra. O mesmo foi constatado utilizando o caldo verde brilhante bile 2% lactose. A quantidade de tubos com presença de gás no tubo de Durhan, caldo verde brilhante bile 2% lactose, e mudança na coloração, caldo soro de queijo, foi 3, 2 e 3 para as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente.



Figura 04: (a) Técnica dos Tubos Múltiplos Número Mais Provável para coliformes totais, caldo verde brilhante e (b) Técnica dos Tubos Múltiplos Número Mais Provável para coliformes totais, caldo soro de queijo púrpura de bromocresol. Fonte: elaboração própria.

O resultado do Número Mais Provável para coliformes totais estão expressos na Tabela 01.

Tabela 01: Resultados da contagem do Número Mais Provável por grama de amostra. Análise utilizando caldo verde brilhante bile 2% e caldo soro de queijo púrpura de bromocresol para amostra de queijo frescal

Análise do NMP	NMP	Metodologia
Caldo verde brilhante bile 2%	290	Instrução Normativa 62 de 26 de Agosto de 2003
Caldo lactose púrpura de bromocresol	290	Instrução Normativa 62 de 26 de Agosto de 2003

* NMP – Número Mais Provável

Fonte: Adaptada da Instrução Normativa 62 de 26 de Agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

Em trabalho realizado por Gomes et al (2014), referente a um meio de cultura a base de soro de queijo para o crescimento de leveduras *Saccharomyces fragilis*, no qual o meio era constituído de peptona e glicose e várias concentrações de soro de queijo foi observado que o meio que apresentou melhor crescimento do microrganismo analisado foi o que continha maior quantidade de soro, sendo assim viável a utilização do soro de queijo como fonte de nutrientes essenciais para o crescimento de *Saccharomyces fragilis*.

Costa et al (2012) investigaram a eficiência do cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em meios de cultivo líquidos e sólidos elaborados com soro de queijo suplementados com cloreto de sódio e extrato de levedura e observaram que, quando comparados com os meios comerciais Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e Baird-Parker (BP), apresentaram crescimento de biomassa e contagem de colônias compatíveis entre eles e os meios comerciais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos testes realizados o soro deve ser diluído em água destilada, pois a não diluição acarretará na formação de coágulos o que tornaria indisponível os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos coliformes totais.

A adição da solução de púrpura de bromocresol deve ser realizada após a esterilização dos tubos contendo o caldo soro de queijo, uma vez que se adicionado antes de se esterilizar haverá mudança na coloração de azul violácea para um tom marrom o que foi observado em procedimentos anteriores aos testes.

Em testes realizados com concentrações menores e superiores a 1 ml de púrpura de bromocresol não possível a verificação da mudança de cor.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, a presente pesquisa demonstrou que é possível formular e utilizar o caldo de enriquecimento a base de soro de queijo com púrpura de bromocresol para a determinação de coliformes totais em substituição ao caldo verde brilhante bile 2% lactose na Técnica dos Tubos Múltiplos, uma vez que na análise realizada no queijo minas frescal foi possível verificar a equivalência de contaminação por coliformes totais obtendo-se os mesmos resultados para ambos os caldos e análises e a inclusão do soro de queijo na microbiologia possibilitando novos estudos de sua aplicação na área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUMEDIA - **PRESENCE-ABSENCE BROTH (7500)**. Leshner Place: Acumedia, v. 3, n. 17, nov. 2010. Disponível em: http://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7500_pt_pi.pdf. Acesso em: 05 fev. 2018.

ALMEIDA, K, E; BONASSI, I, A; ROÇA, R, O. **Características Físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijos Minas Frescal**. 2001. 2 f. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Reagentes, 2018. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/publicacoes/4_edicao/parte1/reagentes.pdf. Acesso em março de 2018.

BRASIL. Lei nº 9.605, de 13 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providencias. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>. Acesso em março de 2018.

CARDOSO, G. S. P. **Avaliação físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado e soros dos queijos minas frescal e mussarela estocados sob diferentes temperaturas**. 2014. 125 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

COSTA – R, A, et al. **Uso de soro de leite bovino para elaboração de meios de cultura para *Staphylococcus aureus***. 2012.

Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/rial71_1_completa/1455.pdf. Acesso em março de 2018.

CUCHINSKI, A, S; CAETANO, J; DRAGUNSKI, D, C. **Extração do corante da beterraba (BETA VULGARIS) para utilização como indicador ácido- base.** 2010. 8 f., Universidade Paranaense, Umuarama.

FERREIRA, H; LIMA, H; COELHO, T. **Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal.** 2014. 10 f. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró.

FONTES, L. **Análises de coliformes por tubos múltiplos.** 2013. Disponível em: <https://bancadapronta.wordpress.com/2013/09/03/analises-de-coliformes-por-tubos-multiplos/>. Acesso em dezembro de 2017.

GEUS, J, A, M; LIMA, I, A. **ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS: Um Comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes.** 2º Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais, 2009, Campos Gerais, p.6.

GOMES, R. J. et al. **Elaboração de um meio de cultura a base de soro de queijo para o crescimento de leveduras SACCHAROMYCES FAGILIS.** 4º Seminário de Iniciação Científica. 2014, Londrina v. 17, p.2.

GREGHI, S, Q. **Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de água, em comparação com a técnica de fermentação em tubos múltiplos.** 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

JÚNIOR, A, A, M; JUNG, C, F. **Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul.** *Ágora*, v. 19, n. 1, p.34-48, 5 jan. 2017. APESC. <http://dx.doi.org/10.17058/agora.v19i1.8446>

KAYSER, M. **Meios de Cultura.** Santa Catarina: Curso Técnico em Análise Química Microbiologia, 2012. 19p.

LINARD, A. **Meios de Cultura.** São Paulo: SP Labor, 2013. 18p.

MARQUEZI, M. **Comparação de metodologias para estimativa do número mais provável (NMP) em amostras de água.** 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba.

NUNES, L; SANTOS, M, G. **Caracterização físico- química de soros obtidos de diferentes tipos de queijos.** 2015. 18p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos)- Universidade Federal De Uberlândia.

RIBEIRO, J, B. **Importância das análises físico- químicas e microbiológicas de leite e de carne bovina “in natura” na saúde pública.** 2010. 91p. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Goiás.

SILVA, M. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema SIMPLATE. 2002. 87p. Dissertação (Mestre em Ciências)- Universidade de São Paulo.

SOUSA, C, P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: Utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. Aps, São Paulo, v. 9, n. 1, p.83-88, jun. 2006.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.