

## CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS PRESENTES NO REQUEIJÃO MORENO

Débora Gabriele de Araújo Gomes<sup>1</sup>, Graça Pereira de Jesus<sup>1</sup>, Hélivio Monteiro de Oliveira<sup>1</sup>, Nicole Eduarda Rosa Oliveira<sup>1</sup>, Bruna Castro Porto Mendes Carvalho<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Discente do curso superior em Engenharia de Alimentos do IFNMG – *Campus* Salinas; <sup>2</sup>Docente do IFNMG – *Campus* Salinas.

### Introdução

O requeijão moreno é um queijo artesanal produzido no norte de Minas Gerais (PINEDA *et al.*, 2021). Queijos artesanais são elaborados por métodos tradicionais, com valorização regional, territorial e cultural, de acordo com protocolos de processamento específicos desenvolvidos para cada variedade. Sua produção deve ser realizada através de boas práticas agrícolas (BPA) e de fabricação (BPF) (BRASIL, 2019).

O processamento do requeijão moreno consiste em: a) coagulação natural do leite integral cru; b) separação das fases creme e coágulo mais soro; c) aquecimento da fase coágulo mais soro; d) primeira dessora; e) lavagem da massa com água; f) segunda dessora; g) cozimento da massa em leite integral cru; h) terceira dessora; i) preparo da manteiga a partir do creme; j) fusão da massa na manteiga; e h) enformagem (DOS SANTOS *et al.*, 2022). A coagulação natural realizada pela fermentação láctica de bactérias ácido-láticas (BAL) proporciona propriedades sensoriais únicas ao produto que variam com a microbiota presente na matéria-prima e no ambiente de produção, sendo o principal método de coagulação para a produção de queijo que se caracteriza pela formação de ácido láctico a partir da lactose como produto principal (SILVA *et al.*, 2017). Os gêneros mais conhecidos de BAL são: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* e *Vagococcus* (SILVA *et al.*, 2017).

Além das características sensoriais, a fermentação láctica promove diversos benefícios nutricionais como melhoria da digestibilidade de proteínas, liberação de ácidos graxos e produção de compostos bioativos (SHARMA *et al.*, 2023). Como forma de conhecer a quantidade de BAL presentes no alimento, o objetivo desse trabalho foi realizar a contagem de BAL presentes no requeijão moreno dos produtores de Fruta de Leite - MG e Salinas - MG.

### Material e Métodos

#### *Material*

Três amostras de 150 g de requeijão moreno de dois produtores provenientes dos municípios de Fruta de Leite – MG e Salinas – MG, totalizando 6 amostras, foram coletadas em sacos estéreis. As amostras foram congeladas no próprio estabelecimento e transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Microbiologia do IFNMG – *Campus* Salinas, onde permaneceram a aproximadamente -18 °C até o momento da análise. Para o descongelamento, as amostras foram mantidas sob refrigeração (8 °C) por 24 h.



## Métodos

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do IFNMG – Campus Salinas de acordo com metodologia descrita por Anvisa (2004), Silva *et al.* (2017) e Frank; Yousef (2004).

Para realizar a contagem de BAL, cada amostra foi cortada em pedaços menores e 25 g foram adicionados em 225 mL de água peptonada 0,1% (H<sub>2</sub>O<sub>p</sub>) para obtenção da diluição 10<sup>-1</sup>. Em seguida, a amostra diluída foi colocada em saco estéril e homogeneizada em homogeneizador “*stomacher*” (ITR<sup>®</sup>, Brasil) por 2 min. Para elaboração das diluições 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>, 1 mL das diluições 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup> foi inoculado em tubo contendo 9 mL de H<sub>2</sub>O<sub>p</sub> 0,1%, respectivamente. As diluições 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> foram homogeneizadas em vortex (Biomixer<sup>®</sup>, Brasil) por 10 s. Posteriormente, por meio do método de profundidade, 1 mL de cada diluição foi inoculado em duas placas de Petri (duplicata) e ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Tm media<sup>®</sup>, Índia) foi adicionado sobre a amostra. A amostra foi misturada ao meio de cultura com movimentos em forma de oito das placas em uma superfície plana com 8 repetições. Esperou-se o endurecimento do meio e adicionou-se mais ágar MRS às placas, quantidade suficiente para cobrir toda a superfície. Após endurecimento do meio adicionado, as placas foram incubadas invertidas a 37 ± 1 °C por 48 h. Para a contagem das BAL, foram selecionadas placas contendo de 25 a 250 colônias, selecionadas 5 colônias e realizados os testes de coloração de Gram e catalase (FRANK; YOUSEF, 2004).

Para a coloração de Gram, utilizou-se o método de Hucker, em que uma gota de solução salina (NaCl 0,85%) (Nuclear<sup>®</sup>, Brasil) foi colocada em uma lâmina de vidro estéril e sobre esta foi emulsionada parte da colônia selecionada. Com auxílio de um bico de Bunsen, realizou-se a fixação do esfregaço. Em seguida, o esfregaço foi coberto com solução cristal violeta (Êxodo Científica<sup>®</sup>, Brasil) 1% (m/v) por 1 min., lavado com água destilada, coberto com solução de iodo (Dinâmica<sup>®</sup>, Brasil) 1% (v/v) por 1 min., lavado novamente sequencialmente com água destilada, etanol 95% por 30 s e água destilada, coberto com solução de safranina (Brasil) 0,5% (m/v) por 10 s e lavado com água destilada. Por fim, pingou-se uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina que foi visualizada em microscópio óptico (Euromex<sup>®</sup>, Holanda) com aumento de 100 x para observação da cor (SILVA *et al.*, 2017).

Para o teste de catalase, uma gota de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% e outra parte da colônia foi adicionada à lâmina. Observou-se se houve (catalase positiva) ou não (catalase negativa) a formação de bolhas (ANVISA, 2004). Foram consideradas BAL as colônias que se apresentaram como Gram positivas e catalase negativas. A contagem de BAL foi expressa em notação científica através da Equação 1.

$$BAL = \frac{P1 + P2}{2} \times \text{inverso do } f_{\text{diluição}} \times f_{\text{colônias confirmadas como BAL}} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde, BAL é a contagem de bactérias ácido-láticas; P1 e P2 são a quantidade de colônias presentes na placa 1 e placa 2 da diluição selecionada, respectivamente;  $f_{\text{diluição}}$  é o fator de diluição selecionado para contagem;  $f_{\text{colônias confirmadas como BAL}}$  é o fator gerado a partir da porcentagem do número de colônias confirmadas como BAL 0 a 100% (0 – 1, respectivamente).

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para comparação das médias aritméticas, aplicou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey utilizando o programa estatístico Minitab<sup>®</sup> 19.1 (2019). Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Os dados da pesquisa são resultados parciais do projeto de extensão intitulado “Criação de um banco de cultura láctica para o requeijão moreno produzido em Salinas – MG” do EDITAL Nº 84/2023 -PROEXC/IFNMG, DE 14 DE MARÇO DE 2023.

A contagem de BAL presente nas amostras de requeijão moreno dos produtores de Fruta de Leite – MG e Salinas – MG foi de  $1,3 \pm 0,2 \times 10^3$  UFC/g e  $3,6 \pm 2,1 \times 10^3$  UFC/g ( $p > 0,05$ ). Dessa forma, não houve diferença significativa entre a concentração de BAL presente nas amostras de requeijão moreno dos diferentes produtores e o alimento possui em torno de  $1,1$  a  $5,7 \times 10^3$  UFC/g de BAL.

### Considerações finais

O requeijão moreno é um queijo artesanal que apresenta cerca de  $1,1$  a  $5,7 \times 10^3$  UFC/g de BAL.

### Agradecimentos

Ao Instituto Federal do Norte Minas Gerais (IFNMG) – *Campus* Salinas pelo apoio financeiro da bolsa de extensão concedida. Aos produtores que contribuíram com a doação das amostras e à Emater pela parceria.

### Referências

- ANVISA, CONGRESSO BRASILEIRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO E EPIDEMIOLOGIA HOSPITALAR, IX., 2004, Salvador. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde [...]. [S. l.]: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. 381 p. v. 1. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_microbiologia\\_completo.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 359, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesón. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 8 set.1997.
- DOS SANTOS et al. **Qualidade microbiológica de requeijão moreno produzido em Salinas – MG: um estudo de caso**, 2022.
- FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. Tests for groups of microorganisms. In: WHER, H. M.; FRANK, J. F. (eds), Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2004. Chapter 8, p. 227-248.
- Lei nº 13.860, de 18 de Julho de 2019 BRASIL., que dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília - DF, 18 de julho de 2019.
- PINEDA, A. P. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. **Frontiers In Microbiology**, São Paulo, v. 12, p. 1-16, 2021.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. D. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. Ed. São Paulo: Blucher, 2017. Cap. 14, p. 209-216. ISBN 978-85-212-1225-6.
- SHARMA, Heena et al. Impact of lactic acid bacteria and their metabolites on the techno-functional properties and health benefits of fermented dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 21, p. 4819-4841, 2023.