



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Vanessa Cortina Zanetti

**Estudo da diversidade microbiana em queijo colonial artesanal através da
metataxonômica e caracterização de potenciais cepas probióticas**

Florianópolis – SC

2024

Vanessa Cortina Zanetti

**Estudo da diversidade microbiana em queijo colonial artesanal através da
metataxonômica e caracterização de potenciais cepas probióticas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Silvani Verruck

Florianópolis – SC

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Zanetti, Vanessa Cortina

Estudo da diversidade microbiana em queijo colonial artesanal através da metataxonômica e caracterização de potenciais cepas probióticas / Vanessa Cortina Zanetti ; orientadora, Silvani Verruck, 2024.

147 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Alterações Bioquímicas. 3. Probióticos. 4. Queijo de Leite Cru. 5. Sazonalidade. I. Verruck, Silvani. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Vanessa Cortina Zanetti

**Estudo da diversidade microbiana em queijo colonial artesanal através da
metataxonômica e caracterização de potenciais cepas probióticas**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 22 de fevereiro de 2024, por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Silvani Verruck, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Anderson Sant'Ana, Dr.
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Adriano Gomes da Cruz, Dr.
Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos



Documento assinado digitalmente
PEDRO LUIZ MANIQUE BARRETO
Data: 21/05/2024 21:22:13-0300
CPF: ***.693.129-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos



Documento assinado digitalmente
Silvani Verruck
Data: 21/05/2024 21:04:47-0300
CPF: ***.960.859-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Silvani Verruck, Dra.
Orientadora

Florianópolis – SC, 2024

*Este trabalho é dedicado aos meus pais e
irmão, que aceitam minha ausência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a vida, ter caminhado ao meu lado durante essa jornada, ter me mostrado o caminho e ter me mantido em pé até o fim.

Agradeço aos meus pais, meu irmão e minhas madrinhas pelo amor, carinho, aceitação e apoio durante a minha ausência, sendo minha base para chegar até este momento.

Agradeço aos meus amigos, em especial a Mariana, Luísa, Lorena, Bianca, Isadora, Renata e Naísa. Vocês são especiais, minha vida é muito mais feliz e colorida com todas vocês.

Agradeço a minha amiga Emanuelli pelo auxílio, companheirismo e amizade durante a realização do mestrado. Agradeço aos meus amigos Callebe e Jamile, por todo o auxílio e parceria durante a realização desta pesquisa. Também agradeço a todos os meus colegas do PPG em Ciência dos Alimentos – UFSC, pelos momentos compartilhados.

Agradeço a minha orientadora, Professora Silvani, pela orientação, pela ajuda, disponibilidade, aceitação, compreensão, pela forma como confiou em mim e me deixou conduzir a pesquisa, pelas oportunidades e por todos os ensinamentos. Você foi e é minha inspiração desde muito antes do mestrado e não posso agradecer mais por ter tido a oportunidade de pesquisar junto de ti.

Agradeço a Professora Jane, Professora Katia e Professor Pedro, por todo o tempo dedicado a mim, pela amizade, conselhos e por tudo que me ensinaram e ajudaram. Agradeço a todos os professores e servidores do PPGCAL e do PPGEAL – UFSC, pelas aulas, conversas e oportunidade de utilizar os laboratórios. Agradeço a professora Dra. Lucélia Cabral, pela colaboração e ensinamentos compartilhados.

Aos professores Dr. Anderson Sant’Ana e Dr. Adriano Gomes da Cruz por terem aceitado fazer parte da minha banca de avaliação. Foi uma honra ter tido a oportunidade de conhecê-los. Sempre foram grandes inspirações.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina por me proporcionar a realização de mais um sonho.

Agradeço ao Governo de Santa Catarina pela concessão da bolsa de Pós-Graduação UNIEDU/FUMDES. Agradeço também as agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) (nº 2021TR001446, nº 2022002005) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (nº 305988/2023-9) pelo financiamento desta pesquisa.

Minha eterna gratidão a todos vocês que me ajudaram nesta conquista.

Se uma pessoa não tem sonhos, ela não tem mais razão para viver. Sonhar é necessário, embora no sonho deva-se vislumbrar a realidade.

(Ayrton Senna)

RESUMO

O queijo colonial artesanal (QCA) é um produto elaborado por métodos tradicionais, a partir do leite cru, com valorização territorial, regional ou cultural. A composição da matéria prima é o principal fator que dá as características de aroma e sabor ao queijo, principalmente devido a sua diversidade microbiológica. A microbiota deste produto pode ser avaliada por métodos clássicos ou por métodos independentes de cultura, como a metataxonômica, a partir do gene 16s rRNA e para bactérias e o espaço intergênico ITS para fungos. Os principais microrganismos encontrados no QCA são bactérias ácido lácticas (BAL), que podem apresentar potencial funcional e/ou tecnológico, sendo algumas delas consideradas potenciais probióticas. Os probióticos são microrganismos que fornecem um benefício a aquele que os ingere em quantidades adequadas, atuando principalmente na melhora do trato gastrointestinal. No entanto, cepas específicas fornecem benefícios diferentes, sendo necessários estudos de avaliação das propriedades benéficas e de segurança individuais. Poucas informações sobre QCA e sua microbiota são encontradas na literatura, dessa forma, esta pesquisa tem a finalidade de avaliar a diversidade microbiana presente em QCA ao longo da maturação através da abordagem metataxonômica, bioquímica e realizar a identificação e caracterização de cepas potencialmente probióticas. O capítulo 1 traz uma revisão na literatura, abordando os principais tópicos sobre queijos, incluindo sua composição química, alterações durante a maturação, principais microrganismos encontrados e formas de detecção. Também foram abordadas informações referentes a microrganismos probióticos e os requisitos para sua classificação. O capítulo 2 aborda a ecologia microbiana e composição física e química do QCA a partir da realização de análises metataxonômicas, microbiológicas, físico-químicas, perfil de ácidos graxos, composição de ácidos orgânicos e compostos voláteis em amostras com 1, 7, 14 e 21 dias de maturação, durante o verão e inverno. As análises metataxonômicas revelaram a presença de 33 famílias de bactérias, com predomínio de *Streptococcaceae* e *Enterobacteriaceae*. Também foram encontradas 18 famílias de fungos, com predomínio de leveduras, variando suas espécies de acordo com a estação analisada. O perfil de ácidos graxos dos queijos mostrou elevadas concentrações de ácidos graxos insaturados, de cadeia curta e CLA, obtendo melhores valores nutricionais nas amostras de verão. O ácido láctico seguido do ácido acético/butírico foram encontrados com as maiores concentrações, principalmente nos queijos de inverno. Os queijos de verão, apresentaram maior variação dos compostos voláteis, com maiores concentrações de álcoois e ácidos carboxílicos. Estes dados contribuem para uma melhor descrição dos padrões de identidade e qualidade do QCA, possibilitando maiores discussões a respeito do produto. Por fim, o capítulo 3 aborda a avaliação de BAL isoladas do QCA, a fim de caracterizá-las como potenciais probióticos. Foram realizadas análises de identificação fenotípica e por metataxonômica de 10 cepas isoladas, avaliação da potencial colonização no hospedeiro a partir de análises de auto-agregação, hidrofobicidade e digestão simulada. Também foram avaliadas a segurança e potencialidade tecnológica por meio de produção de hemolisina, gelatinase, lipase, mucinase e susceptibilidade a antimicrobianos. Todos os isolados apresentaram boa capacidade de adesão ao hospedeiro, ausência de produção de enzimas consideradas fatores de virulência, sensíveis a pelo menos duas classes de antimicrobianos e 2 isolados apresentaram atividade proteolítica. Os resultados confirmaram que todas as 10 cepas apresentam potencial de serem consideradas probióticas, sendo 3 consideradas com maior potencial. De forma geral, conclui-se que o QCA apresenta uma rica composição microbiológica e bioquímica, com a presença de BAL com potencial probiótico.

Palavras-chave: Alterações bioquímicas; Fatores de virulência; Probióticos; Propriedades de adesão; Queijo de leite cru; Sazonalidade.

ABSTRACT

Artisanal colonial cheese (ACC) is a product made using traditional methods, from raw milk, with territorial, regional or cultural value. The composition of the raw material is the main factor that gives the cheese its aroma and flavor characteristics, mainly due to its microbiological diversity. The microbiota of this product can be evaluated by classical methods or by culture-independent methods, such as metataxonomics, based on the 16s rRNA gene and for bacteria and the ITS intergenic space for fungi. The main microorganisms found in ACC are lactic acid bacteria (LAB), which may have functional and/or technological potential, with some of them considered potential probiotics. Probiotics are microorganisms that provide a benefit to those who ingest them in adequate quantities, acting mainly to improve the gastrointestinal tract. However, specific strains provide different benefits, requiring studies to evaluate individual beneficial and safety properties. Low information about ACC and its microbiota is found in the literature, therefore, this research aims to evaluate the microbial diversity present in ACC throughout maturation through metataxonomic and biochemical approaches and to identify and characterize potentially probiotic strains. Chapter 1 provides a literature review, covering the main topics about cheeses, including their chemical composition, changes during maturation, main microorganisms found and methods of detection. Information regarding probiotic microorganisms and the requirements for their classification were also covered. Chapter 2 addresses the microbial ecology and physical and chemical composition of the ACC by carrying out metataxonomic, microbiological, physical-chemical analyses, fatty acid profile, composition of organic acids, and volatile compounds in samples with 1, 7, 14 and 21 ripening days, during summer and winter. Metataxonomic analyzes revealed the presence of 33 families of bacteria, with a predominance of *Streptococcaceae* and *Enterobacteriaceae*. 18 families of fungi were also found, with a predominance of yeast, their species varying according to the season analyzed. The fatty acid profile of the cheeses presented high concentrations of unsaturated fatty acids, short-chain fatty acids and Conjugated Linoleic Acid, obtaining better nutritional values in summer samples. Lactic acid followed by acetic/butyric acid were found in the highest concentrations, especially in winter cheeses. Summer cheeses exhibited greater variation in volatile compounds, with higher concentrations of alcohols and carboxylic acids. This data contributes to a better description of the ACC's identity and quality standards, enabling greater discussions about the product. Finally, chapter 3 addresses the evaluation of LAB isolated from the ACC, in order to characterize them as potential probiotics. Phenotypic and metataxonomic identification analyses of 10 isolated strains were carried out, evaluation of potential colonization in the host based on analyses of auto-aggregation, hydrophobicity, and simulated digestion. Safety and technological potential were also evaluated through the production of hemolysin, gelatinase, lipase, mucinase and susceptibility to antimicrobials. All isolates indicated good ability to adhere to the host, lack of production of enzymes considered virulence factors, sensitive to at least two classes and antimicrobials and 2 isolates showed proteolytic activity. The results confirmed that all 10 strains have the potential to be considered probiotics, with 3 being considered the best isolates. In general, it is concluded that ACC has a rich microbiological and biochemical composition, with the presence of LAB with probiotic potential.

Keywords: Adhesion properties; Biochemical changes; Probiotics; Raw milk cheese; Seasonality; Virulence factors.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Regiões produtoras de queijo colonial artesanal no Brasil	23
Figura 2 – Fluxograma de processamento de queijo colonial artesanal	25
Figura 3 – Esquema básico do experimento de análise metataxonômica	36
Figura 4 – Comprovações necessárias para avaliação de microrganismo probiótico para uso em alimentos	44

CAPÍTULO 2

Análise Metataxonômica e Composição Química do Queijo Colonial Artesanal (QCA) do Sul do Brasil: Explorando a Diversidade Microbiana e os Aspectos Bioquímicos da Maturação

Figura 1 – Abundância relativa (%) de famílias/gêneros de bactérias (A, B) e fungos (C, D) em Queijo Colonial Artesanal (QCA) no verão (S) e inverno (W) durante 1, 7, 14 e 21 dias de maturação	82
Figura 2 – Análise dos Componentes Principais (PCA) relacionando os resultados de ecologia bacteriana (A) e ecologia fúngica (B) com as análises físico-químicas e químicas realizadas no Queijo Colonial Artesanal (QCA)	102

CAPÍTULO 3

Queijo Colonial Artesanal Como Fonte de Bactérias Ácido Láticas Potencialmente Probióticas: Ensaios de Funcionalidade e Segurança

Figura 1 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Bactérias Ácido Láticas (BAL) com potencial probiótico isoladas de Queijo Colonial Artesanal (QCA)	127
--	-----

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

Quadro 1 – Visão generalizada de algumas das tecnologias de sequenciamento genético disponíveis comercialmente	34
Quadro 2 – Principais bactérias ácido lácticas encontradas na análise metataxonômica de queijos	38
Quadro 3 – Principais fungos encontrados na análise metataxonômica de queijos	40
Quadro 4 – Genes de resistência a antimicrobianos, genes de virulência e espécies de BAL em que são encontrados	48

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Análise Metataxonômica e Composição Química do Queijo Colonial Artesanal (QCA) do Sul do Brasil: Explorando a Diversidade Microbiana e os Aspectos Bioquímicos da Maturação

Tabela 1 – Análises Físico-Químicas do Queijo Colonial Artesanal (QCA) no verão (S) e inverno (W) durante 1, 7, 14 e 21 dias de maturação	87
Tabela 2 – Perfil de Ácidos Graxos do QCA	90
Tabela 3 – Ácidos Orgânicos do QCA	93
Tabela 4 – Compostos Voláteis do QCA	96
Tabela 5 – Correlação entre as variáveis e fatores na análise de PCA	100

CAPÍTULO 3

Queijo Colonial Artesanal Como Fonte de Bactérias Ácido Láticas Potencialmente Probióticas: Ensaios de Funcionalidade e Segurança

Tabela 1 – Simulação das condições gastrointestinais para avaliação da resistência de cepas ácido lácticas	120
Tabela 2 – Antimicrobianos, solventes/diluentes e respectivas faixas de concentração utilizadas	124
Tabela 3 – Cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) identificadas oriundas do Queijo Colonial Artesanal (QCA)	126
Tabela 4 – Resistência das cepas de BAL frente as etapas de digestão simulada <i>in vitro</i>	129
Tabela 5 – Resultados das análises de auto-agregação e hidrofobicidade de bactérias potencialmente probióticas isoladas do Queijo Colonial Artesanal (QCA)	131
Tabela 6 – Avaliação da expressão de enzimas consideradas fatores de virulência e com potencial benéfico por bactérias potencialmente probióticas isoladas de Queijo Colonial Artesanal (QCA)	133
Tabela 7 – Resultados de CIM e CBM para bactérias ácido lácticas isoladas de Queijo Colonial Artesanal (QCA)	136

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	18
2.1.	OBJETIVO GERAL	18
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
	REFERENCIAS	19

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.1.	QUEIJO COLONIAL ARTESANAL	22
1.2.	QUÍMICA E BIOQUÍMICA DO QUEIJO COLONIAL ARTESANAL	26
1.3.	MICROBIOLOGIA DO QUEIJO COLONIAL ARTESANAL	28
1.4.	DIVERSIDADE MICROBIANA EM QUEIJOS UTILIZANDO METATAXONÔMICA	33
1.5.	PROBIÓTICOS	42
1.5.1.	Isolamento e Caracterização de Novas Cepas Probióticas	43
	REFERÊNCIAS	51

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE METATAXONÔMICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO QUEIJO COLONIAL ARTESANAL (QCA) DO SUL DO BRASIL: EXPLORANDO A DIVERSIDADE MICROBIANA E OS ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA MATURAÇÃO

	RESUMO.....	71
	Palavras-chave	71
1.	INTRODUÇÃO	72
2.	MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1.	AMOSTRAS	73
2.2.	ANÁLISE METAGENÔMICA	73
2.3.	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	74
2.4.	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	74
2.5.	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E ÍNDICE DE QUALIDADE NUTRICIONAL DA GORDURA	75
2.6.	ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS	77
2.7.	ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	77

2.8.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	78
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1.	ANÁLISE DA ECOLOGIA MICROBIANA	78
3.2.	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	84
3.3.	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E ÍNDICE DE QUALIDADE NUTRICIONAL DA GORDURA	88
3.4.	ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS	92
3.5.	ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	93
3.6.	ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	98
4.	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	103

CAPÍTULO 3 - QUEIJO COLONIAL ARTESANAL COMO FONTE DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS: ENSAIOS DE FUNCIONALIDADE E SEGURANÇA

	RESUMO	116
	Palavras-chave	116
1.	INTRODUÇÃO	117
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	118
2.1.	AMOSTRAS	118
2.2.	ISOLAMENTO DE CEPAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	118
2.3.	ENSAIOS DE IDENTIDADE	119
2.3.1.	Identificação Genotípica	119
2.3.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	119
2.4.	ENSAIOS DE COLONIZAÇÃO NO HOSPEDEIRO	120
2.4.1.	Sobrevivência ao Sistema Gastrointestinal <i>In Vitro</i>	120
2.4.2.	Teste de Auto-Agregação	121
2.4.3.	Teste de Hidrofobicidade	121
2.5.	ENSAIOS DE SEGURANÇA	122
2.5.1.	Atividade Hemolítica e Produção de Gelatinase	122
2.5.2.	Capacidade de Degradação da Mucina	123
2.5.3.	Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos	123
2.6.	ENSAIO DE PRODUÇÃO DE LIPASE PARA AVALIAÇÃO DE POTENCIAL TECNOLÓGICO	124

2.7.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	125
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
3.1.	ENSAIOS DE IDENTIDADE	125
3.2.	ENSAIOS DE COLONIZAÇÃO NO HOSPEDEIRO	128
3.2.1.	Sobrevivência ao Sistema Gastrointestinal <i>In Vitro</i>	128
3.2.2.	Teste de Auto-Agregação	130
3.2.3.	Teste de Hidrofobicidade	130
3.3.	ENSAIOS DE SEGURANÇA	132
3.3.1.	Atividade Hemolítica e Produção de Gelatinase	132
3.3.2.	Capacidade de Degradação da Mucina	132
3.3.3.	Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos	133
3.4.	ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE LIPASES PARA AVALIAÇÃO DE POTENCIAL TECNOLÓGICO	137
4.	CONCLUSÃO	137
	REFERÊNCIAS	138
	 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 145

1. INTRODUÇÃO

O queijo é um derivado lácteo com alto valor nutricional, que apresenta aproximadamente 2000 variações no mundo todo, diferindo principalmente em suas texturas, sabores e aromas (Chauhan; Deshmukh, 2022). Os queijos artesanais apresentam importância econômica e contribuem para a cultura culinária das regiões onde são produzidos, gerando renda e mantendo as tradições locais. Estes são produzidos com tecnologia tradicional, em pouca quantidade, de forma manual e, em sua maioria, utilizando leite cru (Bemfeito et al., 2016; De Gante et al., 2016; Rodríguez et al., 2022). Na região sul do Brasil, o queijo colonial artesanal (QCA) é um dos principais representantes dos queijos artesanais, apresentando tempo médio de maturação de 15 a 30 dias (Kamimura et al., 2019). Para garantir a autenticidade do QCA, a análise da composição química do produto, bem como a obtenção de dados referentes as alterações ocorridas na maturação dos queijos e sua diversidade microbiana são importantes (Margallo et al., 2021).

A microbiota do leite cru utilizado para o preparo do QCA é composta principalmente de bolores, leveduras e bactérias, tendo as bactérias ácido lácticas (BAL) como microbiota dominante (Polo et al., 2020). Estas espécies geralmente são quantificadas por métodos dependentes de cultura com enumeração microbiana. Esses métodos são importantes para a determinação das características de espécies individuais, mas são metodologias trabalhosas, demoradas e requerem meios de cultura diversos. Também há uma limitação adicional devido à incapacidade de cultivo de certos microrganismos em meios de cultura clássicos. Cerca de 70% dos microrganismos permanecem incultiváveis nestas condições devido à ausência de condições de multiplicação, enquanto outros microrganismos apresentam cultivo dificultado (Zotta et al., 2022; Castellanos-Rozo et al., 2020; O'Sullivan; Cotter, 2017). Devido a estas dificuldades, abordagens ômicas têm sido recentemente utilizadas para avaliação microbiológica dos queijos (Tilocca et al., 2020). As abordagens independentes de cultura são capazes de detectar esses microrganismos cultiváveis e não cultiváveis, utilizando amostras de ácidos nucleicos extraídos diretamente da matriz alimentícia, com alta sensibilidade e resolução (Afshari et al., 2020). Abordagens metataxonômicas tipicamente utilizam o rRNA como alvo (16s rRNA para bactérias e 18S ou Espaçador Transcrito Interno (ITS) para fungos), obtendo sequências genéticas que podem identificar gêneros e espécies de microrganismos (Afshari et al., 2020). Neste contexto, o estudo dos microrganismos presentes em QCA é extremamente relevante para auxiliar na otimização do processo industrial, bem como para investigar as interações dinâmicas que ocorrem entre os microrganismos e a matéria-prima (Rios et al.,

2020). Além disso, a partir da análise metataxonômica é possível identificar novas espécies de microrganismos que podem apresentar potencial funcional ou tecnológico (Wolfe et al., 2014).

Uma grande quantidade de BAL, detectadas na análise metataxonômica do queijo colonial artesanal, poderiam ser classificadas como potenciais probióticos (Gao et al., 2021). Esses microrganismos, quando vivos e administrados em quantidades adequadas, fornecem benefícios ao hospedeiro (Hill et al., 2014; Marco et al., 2021). O principal benefício fornecido pelos probióticos é a criação de um ambiente intestinal mais favorável, tendo como principais benefícios a melhora do trato gastrointestinal e sistema imunológico, de modo que outros benefícios são cepa-específicos (Hill et al., 2014). Como os microrganismos apresentam benefícios cepa-dose/específicos, são necessários estudos para verificar as propriedades probióticas e de segurança dos isolados, considerando critérios de seleção definidos por organismos internacionais, como a Organização Mundial da Saúde (Lakhlifi et al., 2023). Assim como em outros países, no Brasil está estabelecido que a linhagem probiótica deve ser segura para o uso pretendido, e essa segurança deve ser demonstrada por meio de testes capazes de evidenciar a inocuidade da linhagem, como a avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos, a capacidade do microrganismo de transferir genes de resistência e virulência, a produção de enzimas que degradam a parede intestinal e a produção de compostos tóxicos, como as aminas biogênicas (Brasil, 2021). Além disso, as espécies precisam sobreviver ao sistema gastrointestinal e colonizar o intestino para que se exerçam seus efeitos benéficos fornecidos, aderindo à mucosa intestinal se este for o local de ação (Lakhlifi et al., 2023).

Poucas informações são encontradas a respeito do QCA na literatura, e estas apresentam dados referentes a características do produto em lotes únicos, ou comparados a queijos variados, sendo que informações referentes a microbiologia e reações bioquímicas do QCA durante o período de maturação são escassas. A sobrevivência e a funcionalidade dos microrganismos presentes durante a fabricação e maturação dos queijos são importantes na avaliação da sua atuação em relação a qualidade do queijo (Zotta et al., 2022). Entender a ecologia microbiana durante a maturação, estudando as mudanças dinâmicas que ocorrem e os produtos de suas reações é essencial para proteger o aspecto tradicional desses produtos e melhorar a compreensão do processo. Com isso, este trabalho está apresentado nos seguintes capítulos:

- a) Capítulo 1, referente a revisão bibliográfica sobre os temas abordados nesta pesquisa;

- b) Capítulo 2, referente ao estudo da análise metataxonômica e composição química do Queijo Colonial Artesanal (QCA) do Sul do Brasil, explorando a diversidade microbiana e os aspectos bioquímicos da maturação; e
- c) Capítulo 3, referente ao Queijo Colonial Artesanal como fonte de bactérias ácido lácticas potencialmente probióticas, ensaios de funcionalidade e segurança.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a avaliação da diversidade microbiana por métodos dependentes e independentes de cultura e composição química presente em queijo colonial artesanal ao longo da maturação, com variação sazonal, além de realizar a identificação e caracterização de cepas potencialmente probióticas isoladas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar bolores e leveduras, mesófilos totais, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, *Listeria monocytogenes*, enterotoxina estafilocócica e bactérias ácido lácticas nas amostras de queijo colonial artesanal ao longo de 21 dias de maturação, no verão e inverno;
- Avaliar a diversidade bacteriana nas amostras de queijo colonial artesanal utilizando as regiões V3-V4 do gene 16s rRNA em uma abordagem metataxonômica;
- Avaliar a diversidade fúngica nas amostras de queijo colonial artesanal utilizando as regiões ITS1-ITS2 da região ITS em uma abordagem metataxonômica;
- Determinar a composição proximal das amostras de queijo colonial artesanal ao longo de 21 dias de maturação, no período de verão e inverno;
- Identificar os compostos voláteis, ácidos orgânicos alifáticos e perfil de ácidos graxos presentes nas amostras de queijo colonial artesanal ao longo de 21 dias de maturação, no período de verão e inverno;
- Isolar bactérias ácido lácticas potencialmente probióticas;
- Definir taxonomicamente as espécies isoladas selecionadas através do sequenciamento do gene 16S rRNA;
- Avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos potenciais probióticos através do método de concentração inibitória mínima;
- Realizar testes complementares para avaliação da segurança e colonização no hospedeiro das cepas potencialmente probióticas.

REFERÊNCIAS

- AFSHARI, R.; PILLIDGE, C. J.; DIAS, D. A.; OSBORN, A. M.; GILL, H. Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 33–47, 2 jan. 2020. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>
- BEMFEITO, R. M.; RODRIGUES, J. F.; SILVA, J. G.; ABREU, L. R. Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7886–7897, out. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11056>
- BRASIL. Guia de Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos. **Guia nº 21/2021** – versão 2, de 05/05/2021. Publicado em: 06 mai. 2021. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/guias#/visualizar/448269>. Acesso em: 01 fev. 2024.
- CASTELLANOS-ROZO, J.; PULIDO, R. P.; GRANDE, M. J.; LUCAS, R.; GÁLVEZ, A. Analysis of the Bacterial Diversity of Paipa Cheese (a Traditional Raw Cow's Milk Cheese from Colombia) by High-Throughput Sequencing. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 218, 6 fev. 2020. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8020218>
- CHAUHAN, S.; DESHMUKH, R. 2022. **Cheese market size, share & growth**. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/cheese-market>. Acesso em: 01 fev. 2024.
- DE GANTE, A. V.; MORENO, A. S.; ESCOTO, F. C. **Los quesos mexicanos tradicionales**. México: Universidad Autónoma Chapingo: Juan Pablos Editor, 2016.
- GAO, J.; LI, X.; ZHANG, G.; SADIQ, F. A.; SIMAL-GANDARA, J.; XIAO, J.; SANG, Y. Probiotics in the dairy industry—Advances and opportunities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 4, p. 3937–3982, 1 jul. 2021. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12755>
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- KAMIMURA, B. A.; MAGNANI, M.; LUCIANO, W. A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; PIMENTEL, T. C.; ALVARENGA, V. O.; PELEGRINO, B. O.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 1 set. 2019a. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12486>
- LAKHLIFI, T.; EL OIRDI, S.; MAROUI, I.; ZOUHAIR, R.; BELHAJ, A. Probiotic properties and safety aspect of three antifungal lactic acid bacteria strains isolated from wheat and camel milk. **Biologia**, v. 78, n. 4, p. 1129–1139, 18 jan. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01319-4>

MARCO, M. L.; SANDERS, M. E.; GÄNZLE, M.; ARRIETA, M. C.; COTTER, P. D.; DE VUYST, L.; HILL, C.; HOLZAPFEL, W.; LEBEER, S.; MERENSTEIN, D.; REID, G.; WOLFE, B. E.; HUTKINS, R. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 3, p. 196–208, 4 mar. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>

MARGALHO, L. P.; KAMIMURA, B. A.; PIMENTEL, T. C.; BALTHAZAR, C. F.; ARAUJO, J. V. A.; SILVA, R.; CONTE-JUNIOR, C. A.; RAICES, R. S. L.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. A large survey of the fatty acid profile and gross composition of Brazilian artisanal cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 101, p. 103955, 1 ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2021.103955>

O'SULLIVAN, O.; COTTER, P. D. Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, v. 1, p. 301–316, 1 jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00012-0>

POLO, E. Q.; PIO, L. C.; NAVARRO, G. G. Selección y caracterización de cepas nativas de enterococcus con potencialidad antimicrobiana aisladas de quesos de elaboración artesanal. **Ecología Aplicada**, v. 19, n. 1, p. 25, 11 maio 2020. <https://doi.org/10.21704/rea.v19i1.1443>

RIOS, D. L.; COSTA, S. de S.; ANDRADE, T. A.; TORRES, P. M. S.; SILVA, L. R. da; CARNEIRO, P. G.; CASSIANO, C. S. S.; MARQUES, W. R. A.; JÚNIOR, J. B. M.; SOUZA, F. A. G. Matatranscriptoma em alimentos: o impacto da expressão gênica do microbioma na saúde humana. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Guarujá: Editora Científica Digital, 2020. Cap. 21. p. 292-306. <https://doi.org/10.37885/201001889>.

RODRÍGUEZ, P. F.; BARRANTES, D. V.; CORTÉS-MUÑOZ, M.; CASTILLO, E. C. Thinking of an Appellation of Origin? Proving the sensory typicity of traditional fresh Turrialba cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 75, n. 1, p. 246–257, 1 fev. 2022. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12815>

TILOCCA, B.; COSTANZO, N.; MORITTU, V. M.; SPINA, A. A.; SOGGIU, A.; BRITTI, D.; RONCADA, P.; PIRAS, C. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, 6 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>

WOLFE, B. E.; BUTTON, J. E.; SANTARELLI, M.; DUTTON, R. J. Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 422–433, jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>

ZOTTA, T.; RICCIARDI, A.; CONDELLI, N.; PARENTE, E. Metataxonomic and metagenomic approaches for the study of undefined strain starters for cheese manufacture. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 14, p. 3898–3912, 2022. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1870927>

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

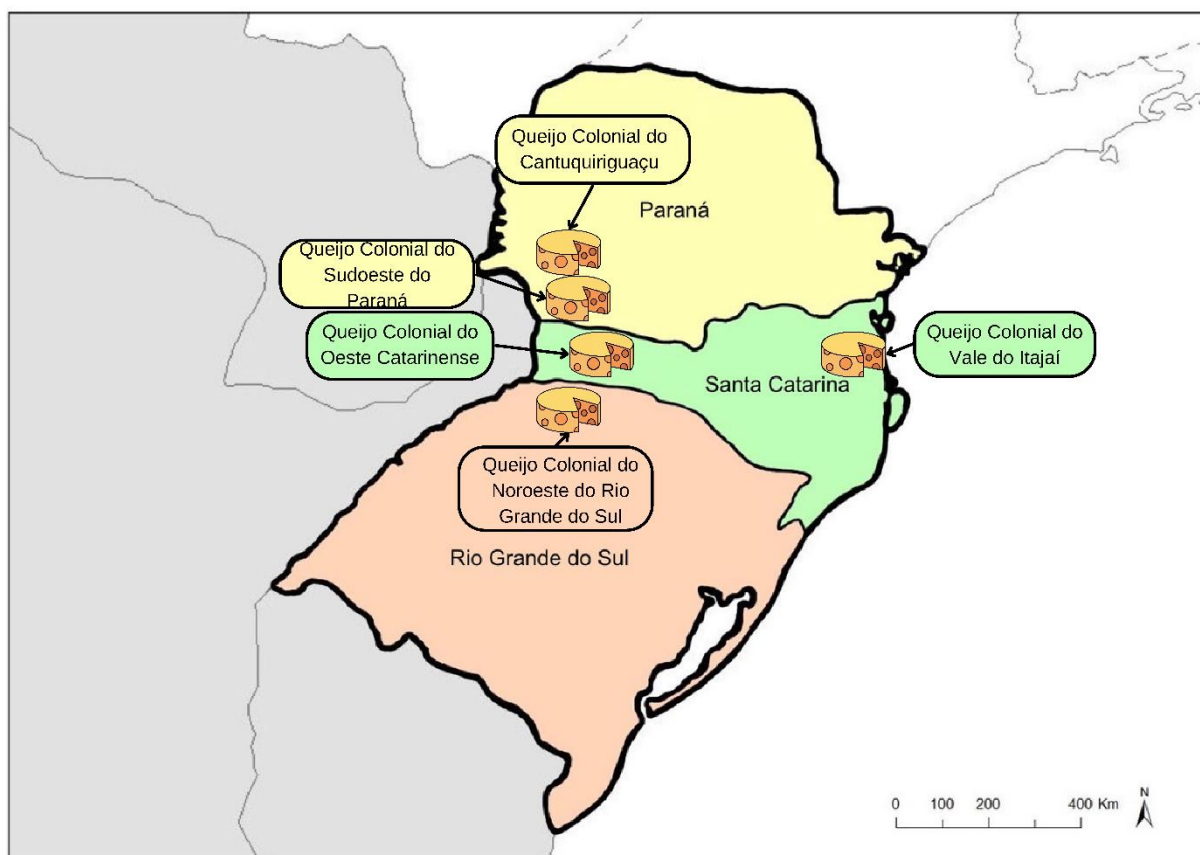
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 QUEIJO COLONIAL ARTESANAL

Queijo é o produto lácteo fresco ou maturado que se obtém por meio da separação parcial do soro em relação ao leite ou ao leite reconstituído ou de soros lácteos, coagulado pela ação do coalho, de enzimas específicas, produzidas por microrganismos específicos, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem adição de substâncias alimentícias, de especiarias, condimentos ou de aditivos (Brasil, 2017). A produção mundial de queijos de leite de vaca em 2020 foi de 25,9 milhões de toneladas, enquanto no Brasil foram produzidos cerca de 1,2 milhão de toneladas, com receita de exportação em torno de 76 milhões de dólares (Minas Gerais, 2022; Faostat, 2023). Por outro lado, 223 mil toneladas de queijos artesanais foram produzidas por agricultores familiares no Brasil, sendo que destes, 8,210 toneladas são produzidas no estado de Santa Catarina (IBGE, 2017).

Mesmo com a industrialização de alimentos em larga escala, alguns consumidores buscam por produtos de origem artesanal, como os queijos artesanais (Freitas, 2015). Segundo o Decreto nº 11.099, de 21 de junho de 2022 (Brasil, 2022), queijo artesanal é aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, conforme protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, e com emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação na produção artesanal. No Brasil, alguns queijos artesanais recebem o nome da região em que são produzidos, aumentando seu valor agregado e fornecendo uma conotação histórica ao produto (Bemfeito et al., 2016). O queijo colonial artesanal começou a ser produzido no Brasil com imigrantes açorianos, sendo posteriormente produzido pelos imigrantes alemães e italianos, que passaram o saber fazer para seus descendentes. A Figura 1 apresenta as regiões onde variedades de queijo colonial artesanal são tipicamente produzidas no Brasil. Esses produtos foram inicialmente produzidos no estado do Rio Grande do Sul e, no século XX, migraram para o oeste de Santa Catarina e Sudoeste do Paraná, junto com seus produtores, ocupando as “colônias”. As colônias são lotes de terra onde os imigrantes europeus se instalaram, sendo a partir de então chamados de colonos, e seus produtos elaborados, chamados de produtos coloniais. O consumo inicial deste produto se deu nas propriedades rurais, juntamente com outros produtos tipicamente encontrados na região, como salame, geleias, pães, conservas e biscoitos (Wilkinson; Cerdan; Dorigon, 2017; Dorigon, 2008, Santos et al., 2017).

Figura 1. Regiões produtoras de queijo colonial artesanal no Brasil.



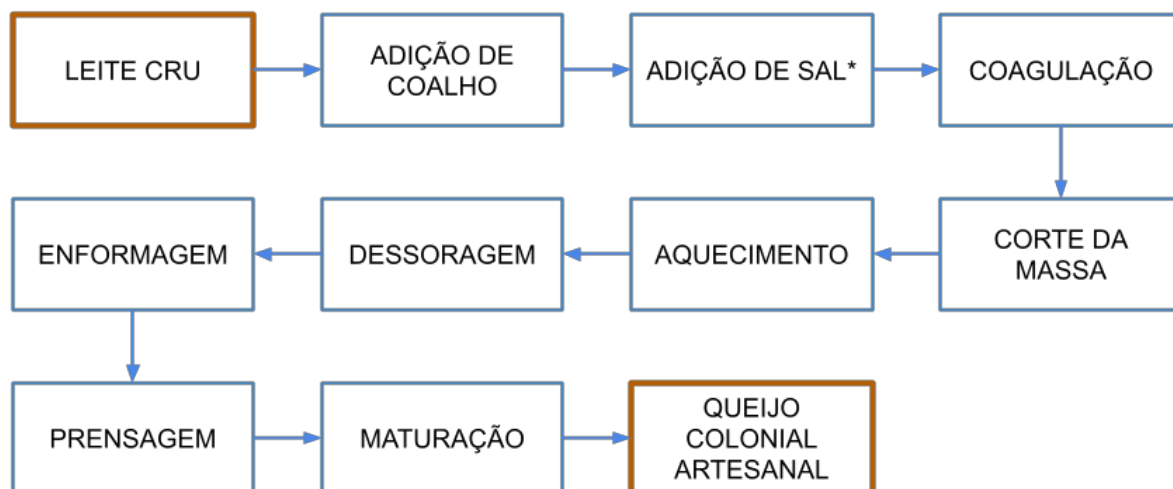
A Lei n. 13.680, de 14 de junho de 2018 (Brasil, 2018a), alterando o artigo 10-A da Lei n. 1.283, de 18 de dezembro de 1950, permite a comercialização interestadual de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal, quando submetidos a fiscalização dos órgãos de saúde pública, de forma que o produto artesanal será identificado com o Selo ARTE. A Instrução Normativa nº 73, de 23 de dezembro de 2019 (Brasil, 2019a), instrui as boas práticas na produção de leite destinado a produção artesanal, legislação auxiliar que deverá ser seguida pelos produtores que desejam ter o Selo ARTE. A IN informa a respeito de procedimentos para garantia da saúde animal, higiene e ordenha, qualidade do leite, alimentos e água de dessedentação de animais, treinamento de colaboradores e ambiência, sendo de fundamental importância a ciência e aplicação das medidas informadas na lei, a fim de garantir um alimento seguro para a comercialização e consumo (Brasil, 2019a). Especificamente para queijos artesanais elaborados por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, que se enquadrem nas definições previstas pela Lei nº 13.860, de 2019, a qual trata a respeito da elaboração e comercialização de queijos artesanais, estes serão identificados por selo único com a indicação Queijo Artesanal (Brasil, 2022; Brasil, 2019b).

O estado de Santa Catarina, por meio da Portaria SAR nº 25, de 20 de agosto de 2020, instituiu o Comitê Estadual do Selo ARTE (CESARTE), a fim de assessorar, dirimir dúvidas, estabelecer parâmetros e propor os procedimentos adicionais necessários para a concessão do Selo ARTE no estado (Santa Catarina, 2020). Para os produtores que obtêm o Selo ARTE, seu produto apresenta conformidade com as boas práticas de fabricação, valorizando o produto, aumentando o mercado e a renda, visto que pode comercializá-lo em todo o país (Correia; Nones, 2021).

Atualmente, no estado de Santa Catarina, 66 produtores de alimentos artesanais utilizam o selo ARTE, sendo que, desse número, 21 são produtores de queijos artesanais, e 17 produtores de queijo tipo colonial artesanal (Santa Catarina, 2023). No entanto, devido a sua produção ser realizada a partir do leite cru, tem-se a necessidade de um regulamento específico de identidade e qualidade para o mesmo, o qual foi recentemente publicado (Santa Catarina, 2021).

Segundo a Lei nº 18.250, de 10 de novembro de 2021, queijo colonial artesanal é “aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação territorial, obtido por coagulação do leite cru, fresco ou não, integral ou parcialmente desnatado, por meio de coalho ou outras enzimas coagulantes, complementada ou não pela adição de fermento lácteo específico e/ou alimento/substância alimentícia” (Santa Catarina, 2021). Ainda, a Lei nº 18.250/2021 afirma que os ingredientes obrigatórios para a elaboração do queijo colonial são leite cru, coalho/coagulante e sal, obtendo assim um produto de consistência macia, firme ou dura, textura elástica, amanteigada ou quebradiça, coloração que varia do amarelo palha a amarelo ouro, sabor ligeiramente ácido ou amendoado e odor lácteo. Os formatos do queijo devem ser redondos, quadrados ou retangulares, com peso que varie de 0,4 a 8 kg (Santa Catarina, 2021). A Figura 2 apresenta o fluxograma de produção do queijo colonial artesanal tipicamente produzido na região oeste de Santa Catarina.

Figura 2. Fluxograma de processamento de queijo colonial artesanal.



Fonte: Adaptado de Kamimura et al. (2019a). *A adição de sal também pode ocorrer após a dessoragem da massa, na coalhada, e ainda, no queijo após a moldagem (Roldan et al., 2023).

O leite é obtido a partir de duas ordenhas diárias, uma pela manhã e outra ao final do dia, de forma que o leite da noite é refrigerado e misturado com o leite da manhã posterior para a fabricação do queijo. O desnate do leite quando utilizado junção de leite de duas ordenhas sequenciais é opcional. A matéria prima é inicialmente filtrada e colocada em panela para iniciar a fabricação. O leite é aquecido até aproximadamente 30°C e, em seguida, é realizada a adição do coalho e do sal. Em torno de 40 minutos depois, a massa coalhada segue para o corte e mexedura para dessoragem. A massa pode ser aquecida aproximadamente a 40°C para promover melhor separação do soro. Após, a massa coagulada é enformada em formas redondas, quadradas ou retangulares. Eventualmente, a salga é realizada após a dessoragem diretamente na massa antes da enformagem. A prensagem é realizada manualmente ou mecanicamente, e fica dessorando na forma de um dia para o outro. Após a desenformagem o queijo é maturado por, no mínimo, 5 dias, e consumido/comercializado. A salga pode ser realizada no leite, antes da coagulação, na coalhada, após a dessoragem da massa e antes da enformagem, e no queijo, após a moldagem do produto (Santa Catarina, 2021; Roldan et al., 2023).

Devido a obrigatoriedade do queijo colonial artesanal ser produzido com leite cru, os produtores devem comprovar o atendimento aos parâmetros microbiológicos (IN 76/18; Portaria nº 146/96) e físico-químicos existentes (IN 76/18), estabelecendo um período de maturação necessário para que o produto esteja microbiologicamente seguro, além de terem implementados programas de boas práticas de ordenha e fabricação, controle de mastite e cloração e controle da potabilidade da água utilizada nas atividades (Brasil, 2018b; Santa Catarina, 2021; Brasil, 2013). O Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, afirma a exclusão

da obrigatoriedade de tratamento térmico o leite que se destine a elaboração dos queijos maturados a uma temperatura superior a 5°C, durante tempo mínimo de 60 dias. No entanto, o queijo colonial artesanal é maturado por tempos inferiores ao exigido, e para serem comercializados de forma legal, deve ser comprovada, por meio de estudos técnico-científicos, a sua qualidade e inocuidade (Brasil, 2017). Além disso, a IN nº 30/13, limita a produção de queijos elaborados a partir de leite cru, maturados abaixo de 60 dias, a queijarias situadas em regiões de indicação geográfica registrada, tradicionalmente reconhecida e em propriedades certificadas como controladas ou livres de tuberculose e brucelose (Brasil, 2013).

1.2 QUÍMICA E BIOQUÍMICA DO QUEIJO COLONIAL ARTESANAL

A duração e as condições do processo de maturação dos queijos têm impacto significativo no desenvolvimento e melhoria do sabor e aroma. O estudo da composição dos metabólitos presentes no queijo colonial artesanal é importante para revelar a diversidade bioquímica de seus constituintes e a correlação com a qualidade do queijo e os atributos sensoriais conferidos pela atividade das culturas iniciadoras e não iniciadoras, enzimas e maturação (Khattab et al., 2019).

A composição da matéria prima influencia diretamente nas características do produto maturado, na atuação dos microrganismos e na formação dos compostos de aroma e sabor. Para garantir a autenticidade do queijo, várias características podem ser avaliadas para a diferenciação entre os produtos artesanais. A composição química e perfil de componentes como ácidos graxos, compostos voláteis e ácidos orgânicos podem ser utilizados como indicadores de autenticidade de queijo colonial artesanal (Katerinopoulou et al., 2020; Danezis et al., 2020). Margalho et al. (2021) analisou a composição proximal de 39 amostras de queijo colonial artesanal produzidos a partir do leite cru oriundos de vacas europeias (Holandês e Jersey), em um tempo de 30 dias de maturação, apresentando um valor médio de 38,9 g/100g de umidade, 24,6 g/100g de proteínas, 28,4 g/100 g de gorduras, 3,94 g/100g de cinzas e 4,14 g/100 g de carboidratos. Ainda segundo o autor, esta variedade de queijo pode ser considerada de média umidade ou de massa semidura (36 – 45,9%) e semigordo (25 – 44,9%) (Brasil, 1996). Adicionalmente, a quantificação de minerais presentes nos queijos é importante para avaliação nutricional, em relação a presença desses micronutrientes em funções metabólicas, formação de ossos, vitaminas, enzimas, hormônios e o funcionamento do organismo (Oliveira et al., 2015). A partir de uma pesquisa realizada por Andrade et al. (2022), observando os resultados

de uma análise do perfil de minerais presentes em 33 amostras de queijo colonial artesanal, os resultados obtidos, em média, foram de 22,90 µg/g de cálcio, 20 µg/g de potássio, 0,76 µg/g de magnésio, 16,30 µg/g de sódio, 0,16 µg/g de manganês, 69,06 µg/g de zinco e 5,87 µg/g de cobre. A concentração de cálcio no queijo não é reduzida em relação ao leite devido à ausência do tratamento térmico, estando todo o cálcio solúvel disponível para formação do para-k-caseinato de Ca devido a interação com a fração (1-105) da k-caseína durante a ação enzimática, levando a agregação das micelas e formação do coágulo (Herman-Lara et al., 2019).

O desenvolvimento das características sensoriais tradicionais e específicas do queijo colonial artesanal ocorrem devido às transformações bioquímicas no período de maturação (Kamimura et al., 2019a). A principal rota metabólica no desenvolvimento de aromas e sabores é proveniente da metabolização da lactose, glicose e citrato, assim como do catabolismo de proteínas (Blaya; Barzideh; Lapointe, 2018). As bactérias iniciadoras do leite metabolizam a lactose em lactato durante o processo de glicólise. O lactato é posteriormente oxidado em acetato e dióxido de carbono por bactérias lácticas não iniciadoras, o que confere a acidez de alguns tipos de queijos (Khattab et al., 2019). A quantidade dos ácidos orgânicos presentes depende da atividade microbiana durante o período de maturação dos queijos (Tomar et al., 2020; Matera et al., 2018). A composição de ácidos orgânicos nos queijos fornece importantes atributos sensoriais, podendo apresentar efeitos desejáveis, mas também indesejáveis no *flavor* dos derivados lácteos, no entanto, não foram encontrados dados na literatura até o momento que houvessem realizado a caracterização de ácidos orgânicos em queijo colonial artesanal.

O queijo produzido a partir do leite cru apresenta processo de maturação acelerado, com sabor e aroma intensificados, devido a proteólise dos peptídeos e aminoácidos e lipólise dos ácidos graxos (Pereira, 2014). A proteólise é o processo responsável pela metabolização, principalmente, das caseínas presentes no leite em peptídeos e aminoácidos livres, a partir de proteinases endógenas do leite e outras enzimas proteolíticas de culturas ácido lácticas (Gan et al., 2016). O período de maturação afeta o grau de proteólise dos queijos, de modo que conforme o aumento do tempo de maturação, maior é o grau de proteólise, tornando a textura do queijo mais quebradiça e menos elástica, promovendo o aumento da intensidade do gosto amargo, além da promoção de compostos de formação de sabor (Joyner et al., 2018; Costa et al., 2017). Além da proteólise, os ácidos graxos livres formados na lipólise são precursores de inúmeros compostos orgânicos voláteis que fornecem sabor aos queijos (McSweeney, 2011). Para avaliação da qualidade sensorial dos queijos artesanais, o perfil de compostos voláteis é considerado uma impressão digital do produto (Bezerra et al., 2016). Os compostos voláteis são liberados durante o período de maturação do produto, sendo encontrados em maior quantidade

quando os queijos são produzidos a partir do leite cru, devido à presença de enzimas e microrganismos que seriam perdidos em tratamento térmico (Kirmaci et al., 2015). Na análise de compostos voláteis de queijo colonial artesanal realizada por Pereira (2021), 34 compostos foram identificados, sendo classificados como ácidos carboxílicos (07), cetonas (07), aldeído (01), álcoois (10), hidrocarboneto (01), éteres (02) e ésteres (06). Os álcoois de maior concentração foram o etanol, butan-2,3-diol, butan-2-ol e 3-metilbutanol. As cetonas pentan-2-ona, butan-2-ona e heptan-2-ona, encontradas em maior quantidade na amostra, foram encontradas também no trabalho de Bertolino et al. (2011), sendo formadas pela oxidação de ácidos graxos livres presentes nos queijos. Os ésteres encontrados, principalmente acetato de etila, butanoato de etila e hexanoato de etila, são encontrados nos queijos de leite cru devido a ação de lipases na formação destes compostos de aroma. Os principais ácidos carboxílicos encontrados foram acético, butanóico, hexanóico e 3-metilbutanóico. Estes são formados a partir da glicólise, lipólise e proteólise, podendo ter ou não origem microbiana (Bertolino et al., 2011).

Além disso, os ácidos graxos de cadeia curta também contribuem para o sabor e aroma dos queijos (Clark et al., 2009). Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA), relacionados a prevenção de doenças, estão presentes em maiores quantidades em queijos maturados, com teores de MUFA de 191,0 mg/100g e PUFA de 109,0 mg/100g (Margallo et al., 2021). A prevalência dos ácidos graxos de cadeia média e cadeia longa são similares aos ácidos graxos encontrados na pesquisa com queijo de leite cru realizada por Ioannidou et al (2022), que demonstrou prevalência de C14:0, C16:0, C18:0 e C18:1c.

1.3 MICROBIOLOGIA DO QUEIJO COLONIAL ARTESANAL

O queijo colonial artesanal é muito apreciado e consumido, mas a sua complexa microbiota tem sido pouco descrita e o aprofundamento de sua caracterização merece atenção. Além disso, a diversidade de técnicas produtivas em locais diferentes torna relevante o mapeamento microbiano, para estabelecer os padrões de qualidade destes produtos (Kamimura et al., 2019b). O queijo artesanal tem sua composição microbiana fortemente influenciada pela qualidade do leite cru, das culturas *starters* adicionadas e das condições de produção. O microbioma do queijo varia de acordo com o tipo e condições ecológicas, ambientais de processo, além da espécie produtora, temperatura e tempo de maturação (Falardeau et al., 2019; Jonnala et al., 2018). A microbiota bacteriana do queijo pode variar de acordo com as práticas

de higiene, podendo conter microrganismos benéficos, microrganismos patogênicos e microrganismos deteriorantes (Panthi et al., 2017).

Os principais microrganismos que representam as bactérias benéficas no queijo colonial artesanal são as bactérias ácido lácticas (BAL). As BAL, em geral, são microrganismos Gram-positivos, catalase negativas, com formação coco ou bacilos, encontradas em meios como o trato gastrointestinal, alimentos fermentados, principalmente lácteos, cárneos e seus respectivos derivados, e silagem. As bactérias ácido lácticas atuam nos alimentos reduzindo o pH e, também, pela produção de peptídeos antagonistas à outras bactérias (Freire et al., 2021). Possuem capacidade de crescimento em pH acima de 3,8, produzindo enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas que promovem a alteração sensorial dos produtos fermentados (Lima et al., 2009).

Até 2020 as BAL compreendiam treze gêneros, sendo eles *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Jay et al., 2005). No entanto, baseados em pesquisas que incluem filogenia do genoma central, genes de assinatura específicos de clado, critérios fisiológicos, identidade de aminoácidos e a ecologia dos organismos, Zheng et al. (2020) propuseram uma reclassificação do gênero *Lactobacillus*, que incluía 261 espécies até o momento da pesquisa, em 25 gêneros, incluindo o gênero *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e 23 novos gêneros, *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* e *Lentilactobacillus*, totalizando até o momento 37 gêneros de BAL. Esses microrganismos são definidos, a partir de sua temperatura de desenvolvimento, em mesófilos (20 – 40°C) ou termófilos (40 – 50°C), sendo inativados em temperaturas acima de 70°C (Nascimento, 2017).

As BAL presentes no queijo podem metabolizar diferentes componentes do leite de formas distintas. As espécies homofermentadoras são aquelas que produzem ácido láctico como principal produto da fermentação. Já as heterofermentadoras, além da produção de ácido láctico, produzem outros componentes, como dióxido de carbono e etanol (Oliveira, 2014). As bactérias heterofermentativas, geralmente não *starters*, são comumente empregadas nos alimentos devido a sua capacidade de produção de compostos de aroma e sabor (Pereira; Santos; Santana, 2020). As culturas *starters*, também chamadas de SLAB (*Starter Lactic Acid Bacteria*) são

culturas iniciadoras, mesofílicas ou termofílicas, importantes para a fermentação da lactose, e consequente redução do pH do alimento, além de degradar a caseína do leite em peptídeos e aminoácidos livres, utilizados em biotransformações com produção de compostos aromáticos. As principais espécies de BAL utilizadas como culturas iniciadoras são *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *L. helveticus* (McSweeney, 2017; Yvon et al., 1997). Nos queijos artesanais, as culturas iniciadoras podem estar presentes de forma autóctone, proveniente das culturas naturais do leite, ou pode ser adicionada, como nos queijos minas artesanais, na forma de “pingo”, por exemplo. O pingo atua como fonte de culturas iniciadoras oriundas do soro do leite cru para a produção do queijo (Parente et al., 2017; Santos et al., 2017). No queijo colonial artesanal, apenas as culturas autóctones provenientes do leite possuem atuação e o conhecimento desta microbiota é importante para avaliação das mudanças do produto durante a maturação e as características de aroma, sabor e textura fornecidas por elas.

As bactérias não *starters*, também conhecidas pela sigla NSLAB (*Non Starter Lactic Acid Bacteria*), são oriundas do leite, ambiente da ordenha ou indústria de beneficiamento, e são conhecidas principalmente pelas alterações que ocasionam em queijos. Estas podem ser desejáveis para a produção de aromas típicos do queijo, ou podem ser indesejáveis, provocando defeitos como aromas indesejáveis, produção de gás com aparecimento de olhaduras e formação de cristais de lactato (Hansen, 2017; Costa et al., 2017). As espécies de NSLAB variam na matéria prima de acordo com fatores como a estação do ano, plantas de laticínios, período de fabricação, e tempo de maturação (Bluma; Ciprovica, 2016). Os principais representantes desse grupo são a família *Lactobacillaceae*, com *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, os quais são heterofermentativos e gêneros de BAL heterofermentativas, como *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* e *Enterococcus* (Beresford et al., 2001; Montel et al., 2014; Gobbetti et al., 2015).

Lactococcus é um gênero de bactérias ácido lácticas homofermentadoras, tendo a espécie *L. lactis* frequentemente como o microrganismo em maior abundância em queijos artesanais produzidos a partir do leite cru. Esse gênero é fundamental na fabricação dos queijos, pois o mesmo atua na acidificação do meio, auxiliando na conservação do produto pela eliminação de patógenos devido a redução do pH, além da formação de compostos de aroma (Bluma, Ciprovica, 2015). A partir de testes bioquímicos se tem a capacidade de diferenciar *Lactococcus* de *Enterococcus*. *Enterococcus* são encontrados em altos números nos queijos artesanais. Esse gênero não é intencionalmente adicionado no leite utilizado para o preparo dos queijos, mas são encontrados nos agentes iniciadores de fermentação utilizados na produção

manual do produto, sendo considerados, algumas vezes, como culturas iniciadoras. Evidências indicam que esse gênero apresenta um papel importante no desenvolvimento do aroma e sabor dos queijos em que são encontrados (Hayaloglu, 2016). Além dos microrganismos já citados, algumas espécies de *Pediococcus*, como *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* apresentam enzimas proteolíticas, como proteases, di-peptidase e aminopeptidase, atuando na maturação do queijo, além de sua atuação como bioprotetores no controle de crescimento de patógenos, como *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp., *S. aureus* e *Listeria* sp. (Raccach, 2014).

Além dos microrganismos benéficos, o queijo artesanal pode conter uma variedade de microrganismos patogênicos, oriundos do leite cru usado no processamento e subsequente sobrevivência durante o processamento, ou também a partir de falhas sanitárias e contaminações pós-processo (D'Amico; Donnelly, 2017). A contaminação do leite, e consequentemente do queijo, por patógenos pode ocorrer por transferência endógena, diretamente do sangue ou por infecção do úbere, ou por transferência exógena, durante ou após o processo de ordenha (Verraes et al., 2015). *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* são os patógenos mais comumente estudados envolvendo queijos, especialmente aqueles produzidos de forma artesanal, responsáveis por causar doenças transmitidas por alimentos (Fox et al., 2017). A sobrevivência destes patógenos é dependente das tecnologias aplicadas no processamento do queijo. A taxa de acidificação e o perfil de tempo e temperatura do processo, incluindo a maturação dos queijos artesanais, umidade e sal são fatores que afetam a sobrevivência e crescimento dos patógenos (Bachmann et al., 2011). Devido a frequência de surtos atribuídos ao leite e seus derivados, a presença de patógenos é um perigo para a saúde pública (Gonzales-Barron et al., 2017). Para reduzir a contaminação do queijo com patógenos algumas medidas podem ser tomadas desde a fazenda. Os patógenos podem ser oriundos do ambiente e do próprio animal produtor de leite. A mastite é a doença mais comum em bovinos, causada por bactérias que contaminam o canal do teto da vaca, podendo ter sua ocorrência reduzida a partir de procedimentos pré e pós-ordenha, como a limpeza e desinfecção dos tetos (Halasa et al., 2011; Magnusson et al., 2006). Após a ordenha, o leite deve ser mantido em temperaturas baixas, para evitar a multiplicação dos patógenos e, após a produção do queijo, o prazo de validade e o adequado armazenamento do produto devem ser respeitados (Verraes et al., 2015). Além disso, é importante que os produtores de queijo de leite cru tenham documentos e abordagens de processo, a fim de garantir a segurança do produto, como manter a baixa contagem de células somáticas e um curto tempo entre a ordenha e o início do processamento do queijo (D'Amico; Donnelly, 2017). Além disso, a utilização da microbiota nativa dos queijos artesanais é uma forma de inibição ou

eliminação dos patógenos, a partir da produção de compostos metabólicos e da competição no crescimento bacteriano (Campagnollo et al., 2022), sendo importante o conhecimento dos microrganismos autóctones presentes.

Benincá et al. (2020) avaliaram as condições higiênico-sanitárias de 6 propriedades rurais do Vale do Taquari – RS, referentes a produção de queijo colonial artesanal. Das 6 propriedades analisadas, 3 se apresentaram não-conformes quanto a presença de coliformes termotolerantes, e todas as propriedades se apresentaram não conformes quanto a contagem de *S. aureus*. Ausani et al. (2019) analisou amostras de queijo colonial artesanal comercializados em Porto Alegre – RS (n=205), obtendo 83 amostras não conformes para *Staphylococcus* coagulase positiva, 22 amostras não conformes para coliformes termotolerantes e 6 amostras positivas para *L. monocytogenes*. Schug et al. (2022) avaliou a presença de *L. monocytogenes* e queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas – RS, obtendo 2 amostras positivas (n=40). Todos os autores justificam seus resultados associando as não conformidades com falhas nas boas práticas de fabricação dos queijos e a presença destes microrganismos nas plantas de produção, indicando qualidade higiênico-sanitária precária com potencial risco a saúde do consumidor.

Além das bactérias, a composição fúngica é fortemente presente nos queijos artesanais, sendo composta principalmente por *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotulola*, *Geotrichum*, *Penicillium* e *Trichosporon* (Issa; Tahergorabi, 2019). Bolores e leveduras apresentam mais facilidade de crescimento no pH dos queijos (4,8 – 5,3), quando comparadas as bactérias e, por essa razão, eles são os primeiros microrganismos a crescerem na superfície do produto (Hayaloglu, 2016). A presença e desenvolvimento destes fungos, quando não desejados, pode causar a formação de odores desagradáveis, alterações da coloração do produto, e alguns deles podem produzir microtoxinas, como é o caso de espécies de *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.* (Zacarchenco et al., 2011). No entanto, combinações de fungos, como *G. candidum*, *D. hansenii*, *P. camemberti*, são adicionados ao queijo, sendo responsáveis por algumas características típicas, como a contribuição na formação de cor, odor, textura, sabor, aroma, aparência, além de atividade antimicrobiana com interações sinérgicas ou antagonistas. As bactérias, principalmente *Lactococcus sp.*, desenvolvem a acidez do queijo criando um meio favorável ao desenvolvimento dos bolores e leveduras (Hayaloglu, 2016). Por outro lado, o estudo realizado por Mareze et al. (2022) a partir de lactobacilos isolados de queijo serrano artesanal, detectou atraso na atividade metabólica de duas espécies de *Penicillium sp.* (*P. commune* e *P. nordicum*), quando colocado na presença de *L. plantarum*, demonstrando que a cepa apresentou propriedades antifúngicas, não somente pela acidificação por ácidos

orgânicos ou por um metabólito específico, mas sim por um conjunto de metabolitos inibidores fúngicos, ainda não claramente elucidados. As cepas de *L. plantarum* estudadas também apresentaram halos de inibição bem definidos contra *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, sendo *Salmonella* Typhimurium a mais afetada e *L. monocytogenes* a menos afetada. Esses resultados demonstram que a microbiota autóctone do queijo artesanal atua como bioconservante no próprio meio, inibindo a microbiota indesejável. Além disso, os microrganismos que apresentam as propriedades de biopreservação possuem aplicação para outros produtos como forma de conservação biológica, substituta aos conservantes químicos utilizados.

Abordagens combinadas para avaliação da diversidade populacional, como a combinação de métodos dependentes e independentes de cultura fornecem uma sensibilidade mais alta. No geral, estas abordagens combinadas são a única maneira de se obter dados abrangentes da estrutura e dinâmica das populações das bactérias presentes no queijo (De Filippis et al., 2016; Erkus et al., 2013; Somerville et al., 2019; Zotta et al., 2022).

1.4 DIVERSIDADE MICROBIANA EM QUEIJOS UTILIZANDO METATAXONÔMICA

Os estudos microbiológicos tradicionais são baseados na identificação, isolamento, caracterização e contagem de espécies microbianas individuais (Tilocca et al., 2020). No entanto, abordagens tradicionais baseadas em cultura promovem a seleção incompleta dos microrganismos e não possuem a capacidade de recuperação de bactérias não cultiváveis (Zotta et al., 2022). Por isso, a comunidade microbiana analisada por sequenciamento de alto rendimento (SAR) é uma das abordagens mais comuns utilizadas para o estudo da estrutura taxonômica e dinâmica de comunidades microbianas em alimentos fermentados (De Filippis et al., 2018). Os métodos de tipagem baseados em sequenciamento de DNA surgiram como alternativas para os métodos de identificação fenotípicos clássicos (Kazou et al., 2021). O sequenciamento genômico é uma técnica de identificação da sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, visando conhecer a informação genética contida nessa estrutura. As duas primeiras tecnologias de sequenciamento genético surgiram no ano de 1977, por Maxam e Gilber e por Sanger. Maxam e Gilbert desenvolveram uma tecnologia baseada em hidrólise química e Sanger e colaboradores desenvolveram uma tecnologia baseada em reações enzimáticas, possibilitando a determinação da sequência de nucleotídeos de um fragmento de DNA (Fietto; Maciel, 2015). As tecnologias de sequenciamento de próxima geração (NGS)

ganharam destaque após o sequenciamento do genoma humano, publicado em 2001, a partir dos sequenciadores de segunda geração (Venter et al., 2001). Os sequenciamentos de segunda geração possuem a capacidade de paralelizar a reação de sequenciamento de maneira massiva, gerando grande quantidade de dados muito rapidamente, a um custo moderado (Gupta; Gupta, 2020). O 454 GS 20, primeiro sequenciador de segunda geração analisa o DNA a partir da clivagem, PCR em emulsão de moléculas únicas e posterior pirosequenciamento. As tecnologias Illumina e Ion, também são representantes da segunda geração. A primeira baseia-se na utilização de nucleotídeos marcados com fluorescência para sequenciamento de clusters e a segunda utiliza semicondutores de íons (Christoff, 2017; Gupta; Gupta, 2020)

Já o sequenciamento de terceira geração está relacionado às tecnologias que interrogam moléculas únicas de DNA sem necessidade de amplificação. Tendo como principais representantes as tecnologias desenvolvidas pela Pacific Biosciences, baseada na atividade intrínseca das enzimas DNA-polimerases de catalisarem a síntese de uma fita complementar de DNA com base na sequência de nucleotídeos de uma fita molde, e a tecnologia desenvolvida pela Oxford Nanopore Technologies, baseada na mudança de corrente elétrica através dos nanoporos (Gupta; Gupta, 2020). O Quadro 1 apresenta as gerações de sequenciamento e os principais dados referentes as tecnologias utilizadas.

Quadro 1. Visão generalizada de algumas das tecnologias de sequenciamento genético disponíveis comercialmente.

Geração	Companhia	Plataforma	Tamanho máximo de reads (pb)	Quantidade máxima de reads	Tempo de corrida	Acurácia (%)
1ª	ABI	3730	400 – 900	96	20 min – 3 h	-
2ª	Roche	454 GS 20	700	1 M	10-23 h	99,5
	Illumina	MiSeq	2 x 300	25 M	4 – 55 h	> 99,9
		MiniSeq	2 x 150	25 M	4 – 24 h	
		NextSeq 1000		1,2 B	19 – 48 h	
		NovaSeq X		1,6 – 26 B	21 – 48 h	
		HiSeq 3000		2,1 – 2,5 B	1 h – 3,5 dias	
	ThermoFisher	Ion GeneStudio S5 System*	200 – 600	60 – 80 M	6,5 – 19 h	> 99
		Ion Proton System**			2,5 h	
		Ion PGM Dx System***		4 – 5,5 M	4,4 h	
3ª	Pacific Biosciences	Sequel II System	Até 40 kb	> 4 M	1 – 6 h	99
	Oxford Nanopore Technology	MinION	Até 4 Mb	> 0,1 M	Imediato	> 99
		GridION				
		PromethION				

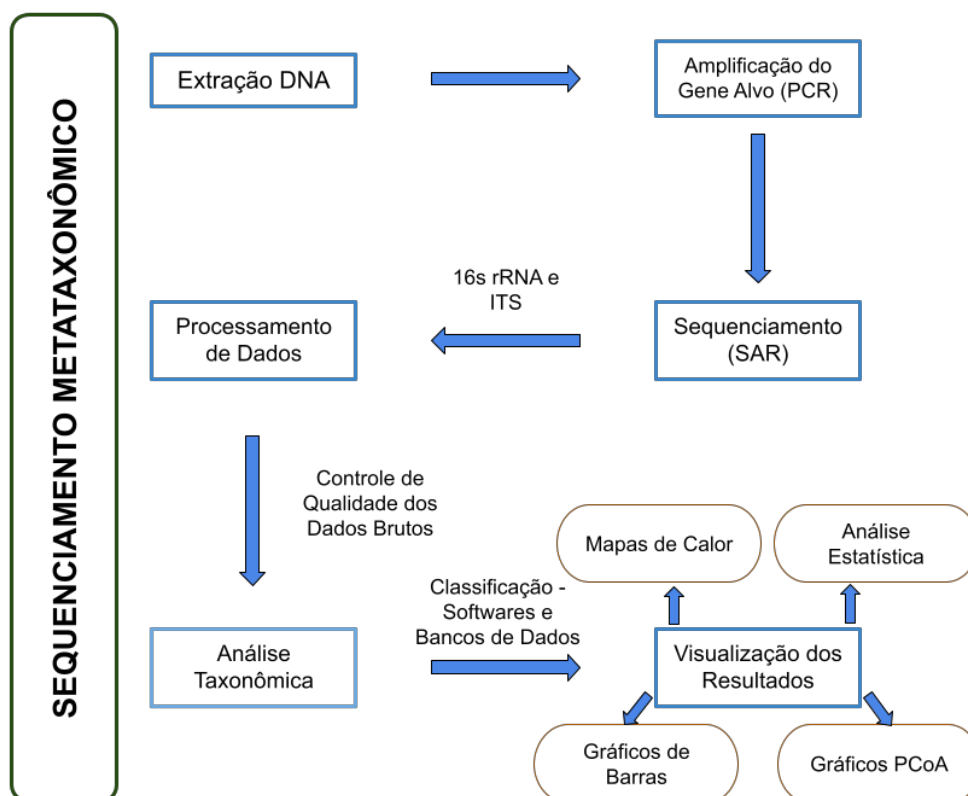
Fonte: Adaptado de Oakley et al. (2015), Christoff (2017), ThermoFisher Scientific (2022a, b, c, d), Illumina (2022a, b, c, d, e), Oxford Nanopore Technologies (2023a, b, c). *Ion 540 Chip **Ion PI v3 Chip ***Ion 318 Dx Chip.

Atualmente, as abordagens mais utilizadas para o estudo da microbiota se dão a partir do NGS dos genes ou regiões relevantes, como o gene 16s rRNA para bactérias e a região ITS (Espaçador Transcrito Interno) para fungos. O gene 16s rRNA é constituinte de qualquer bactéria/archaea e a sua sequência consiste em nove regiões hipervariáveis (chamadas de “V1” a “V9”), que contém a informação filogenética do gene, separados por regiões altamente conservadas (Yang et al., 2016). Durante a análise genômica, as sequências de amplicons do gene 16s rRNA são agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). Esse termo se refere ao agrupamento de organismos intimamente relacionados, com um limite de semelhança que varia de 97 ou 99% de similaridade, o qual é considerado pertencente ao mesmo gênero ou espécie (Kopylova et al., 2016; Mayo et al., 2014; Westcott; Schloss, 2015). Os estudos de ecologia microbiana baseados em gêneros ou maiores níveis podem ser realizados quando grandes mudanças nas populações microbianas são esperadas. No entanto, para o queijo colonial, são necessários os níveis de espécie ou cepas, pois diferentes espécies ou cepas do mesmo gênero podem ocorrer no mesmo ambiente e podem conter diferentes informações genéticas que tornam sua diferenciação proveitosa (De Filippis et al., 2016; Cocolin; Ercolini, 2015). A abordagem metataxonômica (Figura 3) tem sido utilizada para a identificação de espécies indefinidas a fim de melhor conhecer os processos de fermentação/maturação dos alimentos.

A análise do DNA exige uma grande quantidade de capacidade de processamento e armazenamento de dados, pois o volume de dados gerados durante o sequenciamento pode ultrapassar 15TB, sendo necessária a utilização de algoritmos capazes de processar essa grande quantidade de dados, além da utilização de métodos computacionais para o fornecimento de resultados confiáveis. A partir disso, foram criados *pipelines* analíticos para a pesquisa, desenvolvidos especialmente para a análise dos dados metagenômicos dos organismos (Shen, 2019; Navgire et al., 2022). Os *pipelines* atuam em duas etapas de fluxo de trabalho, o pré-processamento, relacionado ao controle de qualidade das sequências obtidas, e a quantificação, que identifica as unidades taxonômicas operacionais, suas interações potenciais e potencial funcionais. A etapa de quantificação possui dois submódulos, o perfil taxonômico e o perfil metagenômico preditivo. Leituras sem acertos ou com acertos inferiores a 93% de similaridade permanecem não classificadas e, não necessariamente, todas as OTUs identificadas apresentam dados taxonômicos a níveis de espécie. As OTUs com abundância superior a 0,5% passam por uma filtração dos dados, a fim de remover aquelas não identificadas (Mataragas et al., 2018). Os genomas são analisados comparando os dados obtidos com sequências presentes em bancos de dados públicos ou privados, como Greengenes, GenBank, Silva, EzBioCloud e UNITE.

Alguns *pipelines* automatizados foram desenvolvidos para a análise do genoma completo, de maneira que diversos softwares são aplicados de maneira conjunta para alcançar resultados interpretáveis (Schloss; Handelsman, 2005).

Figura 3. Esquema básico do experimento de análise metataxonômica.



PCR = Reação em Cadeia de Polimerase; SAR = Sequenciamento de Alto Rendimento; ITS = Espaçador Transcrito Interno; PCoA = Análise das Coordenadas Principais.

A comparação entre a composição de culturas de diferentes queijos se mostra difícil, devido a diferenças dos genes avaliados, nas plataformas de sequenciamento e nas abordagens de bioinformática utilizadas. O uso de estudos com sequenciamento realizado pela mesma plataforma, gene alvo e abordagem de bioinformática promovem uma visualização mais clara das relações entre os diferentes tipos de queijo e seus fatores interferentes (Zotta et al., 2022). As culturas artesanais estão em equilíbrio dinâmico e a sua composição pode variar significativamente ao longo do tempo. Devido ao efeito seletivo do pH e, às vezes, da temperatura, a abundância relativa acumulada em queijos é dominada por 1 a 3 espécies de microrganismos, além de uma grande quantidade de espécies em menor abundância também é frequentemente identificada (Zotta et al., 2022). No entanto, as técnicas de SAR apresentam algumas limitações. A metataxonômica não detecta mudanças importantes em nível de espécie

ou pode apresentar erros na etapa de amplificação por PCR e as leituras de sequências curtas de genes, como é o caso do sequenciamento de segunda geração, apresentam resolução limitada (Niccum et al., 2020; O'Donnell et al., 2020; Walsh et al., 2017). Estudos sobre a microbiota dos produtos lácteos apresentam poucas informações em relação às comunidades microbianas, principalmente devido a estas limitações experimentais. Em alguns casos, um marcador genético não é suficiente para a identificação metataxonômica ou os bancos de dados utilizados estão incompletos, o que dificulta a exploração total do SAR no estudo da microbiota (Verce et al., 2019).

Consideradas como mais abundantes em queijos, o Quadro 2 apresenta as principais BAL encontradas na análise metataxonômica de queijos. Nelli et al. (2023) avaliou a diferença na microbiota do queijo de cabra na produção artesanal e na produção industrial. O queijo artesanal produzido com leite de diferentes produtores apresentou maior variação no perfil microbiano, comparado ao queijo artesanal com leite de um único produtor e o queijo industrial. Os autores também observaram dominância de *Lactobacillaceae* na produção artesanal e *Streptococaceae* na produção industrial. Enquanto isso, o estudo de Suárez et al. (2020) relacionado a seleção de espécies bioprotetoras, observou a presença de genes codificadores de bacteriocinas em *Streptococcus* sp. e *Enterococcus* sp. e dez colônias apresentaram atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*, essas identificadas como *E. faecium*, sendo considerada um potencial conservante de alimentos. Além da capacidade de bioproteção, é válido saber se a embalagem utilizada durante a maturação dos queijos promove mudanças na microbiota. Spyrelli et al. (2020) avaliou a relação entre a embalagem utilizada na maturação e a microbiota do queijo, não detectando influência dos materiais utilizados (plástico e aço inoxidável) na composição microbiológica do produto durante os 120 dias de análise.

Existe uma alta variabilidade nos tipos de culturas encontrados nos queijos, porém, alguns agrupamentos são evidentes quando analisados (Zotta et al., 2022), como é o caso dos queijos artesanais produzidos em diferentes locais no Brasil, nos estudos de Myazaki (2021), Kamimura et al. (2019, 2020), Erhardt et al. (2023) e Sant'Anna et al. (2019), onde todos apresentaram abundância de microrganismos do gênero *Lactococcus* sp. e espécies da família *Lactobacillaceae*, diferindo-se na microbiota de menor abundância, mesmo sendo com diferentes tipos de queijos. O gênero *Lactococcus* é o que possui maior diversidade de espécies. Variadas espécies de lactobacilos também foram encontradas nestes trabalhos, tipicamente encontradas em maior abundância após a ação das bactérias iniciadoras e a salga dos queijos (Perin et al., 2017). Adicionalmente, Kamilari et al. (2022) associaram a microbiota com a localização geográfica dos queijos da Irlanda, Grécia e Chipre. O queijo produzido na Irlanda

apresentou *Lactococcus* sp. como gênero dominante. Os queijos gregos foram dominados por *Streptococcus* sp. e *Lactobacillaceae* e os queijos de Chipre por *Lactobacillaceae*, *Lactococcus* sp. e *Streptococcus* sp., concluindo que o fator ambiental se mostrou influente na diversidade das bactérias, podendo ser considerado um fator determinante para a impressão digital do produto. Enquanto isso, Zago et al. (2021) concluiu que a origem das amostras de queijo teve um impacto na riqueza, uniformidade e abundância relativa das espécies bacterianas, além de diferenças de tecnologia e práticas agrícolas. Ademais, Gezginc et al. (2022) também relacionou a composição microbiana e a composição de compostos voláteis nos queijos. Os autores concluíram que a composição microbiana dominante, constituída por BAL, desempenha um papel importante na formação de compostos voláteis responsáveis pela formação principalmente das características de aroma dos queijos.

Quadro 2. Principais bactérias ácido lácticas encontradas na análise metataxonômica de queijos.

Tipo de Queijo	Tecnologia de Sequenciamento	Região/Gene Pesquisado	Gêneros/Espécies Dominantes	Referências
Colonial	Illumina MiSeq	V3/V4 – 16s rRNA	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterococcus</i> sp. <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Enterococcus italicus</i> <i>Lactococcus garvieae</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Erhardt et al. (2023)
Gidotyri	Illumina MiSeq	V3/V4 – 16s rRNA	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus</i> sp. <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Lactiplantibacillus</i> sp. <i>Hafnia alvei</i>	Nelli et al. (2023)
Tulum	Illumina MiSeq	V4 – 16s rRNA	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactiplantibacillus xiangfangensis</i> <i>Pediococcus. parvulus</i> <i>Streptococcus parauberis</i> <i>Lactococcus garvieae</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Gezginc et al. (2022)
Irlandes e do Mediterrâneo Oriental	Illumina MiSeq	V3/V4 – 16s rRNA	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Lactococcus</i> sp. <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus zeae</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Kamilari et al. (2022)
Grana Padano	Illumina MiSeq	V3/V4 – 16s rRNA	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> <i>Lactocaseibacillus casei</i> <i>Limosilactobacillus fermentum</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i>	Zago et al. (2021)

			<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i>	
Colonial	Illumina MiSeq	V3/V4 – 16s rRNA	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Corynebacterium variabile</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> <i>Lactocaseibacillus casei</i> <i>Enterococcus italicus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Bavariicoccus seileri</i> <i>Corynebacterium terpenotabidum</i>	Myazaki (2021)
Artesanal	Illumina MiSeq	V4 – 16s rRNA	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus macedonicus</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Macroccoccus caseolyticus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Enterococcus saccharominimus</i> <i>Acinetobacter johnsonii</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Streptococcus suis</i>	Suárez et al. (2020)
Feta	ThermoFisher Ion PGM	V2-4-8/V3-7-9 – 16s rRNA	<i>Lactococcus sp.</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Lactobacillaceae.</i> <i>Flavobacterium sp.</i> <i>Carnobacterium sp.</i>	Spyrelli et al. (2020)
Serra da Canastra	Illumina MiSeq	V3/V4 – 16s rRNA	<i>Lactococcus sp.</i> <i>Lactobacillaceae</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>Leuconostoc sp.</i>	Kamimura et al. (2020)
Minas	Illumina MiSeq	V3/V4/V5 – 16s rRNA	<i>Lactococcus sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Weissella sp.</i> <i>Lactobacillaceae</i> <i>Leuconostoc sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Leuconostocaceae</i>	Sant'Anna et al. (2019)
Colonial	Illumina MiSeq	V3/V4 – 16s rRNA	<i>Lactococcus sp.</i> <i>Lactobacillaceae</i> <i>Leuconostoc sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i>	Kamimura et al. (2019b)
Serrano	Illumina MiSeq	V3/V4 – 16s rRNA	<i>Lactococcus sp.</i> <i>Lactobacillaceae</i> <i>Leuconostoc sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Enterococcus sp.</i>	Kamimura et al. (2019b)

Além das bactérias, os queijos apresentam uma microbiota fúngica muito variada. O sequenciamento ITS permite a caracterização inicial direta da maioria dos isolados fúngicos obtidos em produtos lácteos, identificando gêneros e espécies (Buehler et al., 2017). As regiões

ITS1 e ITS2 fornecem resultados semelhantes, mas rendem diferentes resoluções taxonômicas. A região ITS2 foi considerada mais apropriada para caracterização de ecossistemas fúngicos em queijos especiais de pasta mole, cura natural e cura lavada, nas variedades macio, semi-duro e duro (Raymond-Fleury et al., 2022). O Quadro 3 apresenta os fungos mais abundantes em amostras de queijo a partir da análise metataxonômica utilizando a região ITS.

Quadro 3. Principais fungos encontrados na análise metataxonômica de queijos.

Tipo de Queijo	Tecnologia de Sequenciamento	Região/Gene Pesquisado	Gêneros/Espécies Dominantes	Referências
Quebec Terroir	Illumina MiSeq	ITS1/ITS2	<i>Geotrichum sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Debaryomyces sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Scopulariopsis sp.</i> <i>Cluyveromyces sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Acremonium sp.</i>	Raymond-Fleury et al. (2022)
Robiola di Roccaverano	Illumina	D1 – 26s rRNA	<i>Galactomyces candidum</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Cluyveromyces marxianus</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Trichosporon coremiiforme</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Kurtzmanella anglica</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Geotrichum bryndzae</i>	Biolcati et al. (2022)
Colonial	Illumina MiSeq	ITS1/ITS2	<i>Diutina catenulata</i> <i>Clavisporea lusitaniae</i> <i>Kodamaeae ohmeri</i> <i>Cluyveromyces marxianus</i> <i>Candida ethanolica</i> <i>Tricholoma matsutake</i>	Cardoso (2021)
Austrian Vorarlberger Bergkäse	Illumina MiSeq	18s rRNA	<i>Candida sp.</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Scopulariopsis sp.</i> <i>Yamadazyma sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Arachnomyces sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Chrysosporium sp.</i>	Quijada et al. (2020)
Artesanal	Illumina MiSeq	ITS1	<i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Trichosporon coremiiforme</i> <i>Cluyveromyces lactis</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Candida sp.</i>	Isidório (2019)
Minas Artesanal	Illumina	ITS2	<i>Trichosporon sp.</i> <i>Candida catenulata</i> <i>Kodamaeae ohmeri</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Debaryomyces sp.</i>	Aragão (2018)

<i>Fusarium redolens</i> <i>Acremonium citrinum</i> <i>Aspergillus sp.</i>
--

O estudo de Aragão (2018) avaliou a microbiota dos queijos produzidos na região do Serro em diferentes estações do ano e condições climáticas (verão/úmido e inverno/seco). O autor concluiu que após o décimo quinto dia as populações fúngicas permaneceram inalteradas, as espécies de leveduras são influenciadas pela duração do período de maturação e as temperaturas mais baixas e a umidade relativa do ar dificultam o crescimento de fungos filamentosos no queijo. Por outro lado, a microbiota fúngica dos queijos estudados por Isidório (2019) apresentou a dominância de *D. hansenii*, não variando com as estações do ano, já a composição de *Debaryomyces sp.* e *Trichosporon sp.* variaram, sendo a primeira encontrada em quantidades maiores durante os meses de julho e outubro, e a segunda entre novembro e junho. Os autores concluíram que a variação fúngica dos queijos sofre um processo de transição durante períodos de seca.

O estudo de Raymond-Fleury et al. (2022) avaliou a composição fúngica de queijos de casca lisa, lavada e natural, apresentando composição microbiana semelhante entre todas as cascas e massa dos queijos, com uma microbiota conhecida como culturas de maturação. Por outro lado, Quijada et al. (2020), na avaliação da composição fúngica de cascas de queijo durante a maturação, observou uma variação de abundância conforme o tempo de maturação foi alterado, tendo *Candida sp.* em maior número no tempo 0 e *Debaryomyces sp.* entre 14 e 30 dias. Estes autores concluíram que a presença de determinados fungos em tempos de maturação específicos é relevante para a maturação adequada dos queijos.

Cardoso (2021), na avaliação do queijo colonial, detectou a presença de 19 espécies de leveduras, com dominância de *D. catenulata* (76,44%), que contribuem para a formação do aroma do produto. Além disso, Biocalti et al. (2022), avaliou a composição fúngica do queijo “Robiola di Roccaverano” em 5 e 15 dias de maturação de 5 laticínios italianos. Os queijos apresentaram um núcleo fúngico constituído por *G. candidum* e *K. marxianus*, independentemente do tempo e local de produção dos queijos. No entanto, populações específicas encontradas nas diferentes amostras podem auxiliar na determinação de uma identidade específica para os queijos.

Os queijos artesanais apresentam uma mistura diversa de espécies de microrganismos, alguns dos quais ainda não foram sequenciados e/ou os dados relevantes ainda não divulgados (Afshari et al., 2018). A avaliação dos microrganismos viáveis e a sua atuação durante o processamento e maturação dos queijos apresenta resultados fundamentais em relação a

qualidade (Zotta et al., 2022). A aplicação do sequenciamento de DNA de alto desempenho fornece a composição microbiológica, auxiliando na exploração de métodos para melhorar a caracterização do produto e segurança do alimento, pelas informações a respeito da presença de microrganismos de interesse, como alguns potenciais probióticos.

1.5 PROBIÓTICOS

Segundo Hill et al. (2014), o termo probiótico é definido como organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício a saúde do hospedeiro. O mecanismo de ação dos probióticos consiste, mas não se limita, no melhoramento da qualidade da microbiota intestinal pela exclusão competitiva de microrganismos patógenos, produção de metabólitos funcionais como aminoácidos, ácidos graxos de cadeia curta e enzimas. Algumas espécies de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. também melhoram a barreira protetora nas células epiteliais intestinais, fortalecendo a camada de muco e as junções apertadas entre os enterócitos (Li et al., 2020).

Os microrganismos probióticos podem receber dois pareceres de segurança. Os Estados Unidos classificam os microrganismos que podem ser utilizados em alimentos como “Geralmente Reconhecido como Seguros” (GRAS). O GRAS é fornecido pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), e é conferido a substâncias que tenham dados comprovando serem seguros nas condições de uso pretendido (FDA, 2022). O parecer de segurança “Presunção de Segurança Qualificada” (QPS), é certificado pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA), para os microrganismos submetidos a avaliação de segurança, com estabelecimento de identidade, possível patogenicidade e uso final do microrganismo (EFSA, 2022). Algumas espécies de BAL são GRAS ou QPS, naturalmente encontradas no intestino e reconhecidas como probióticas em potencial (Wojtyniak; Szajewska, 2017). Atualmente 84 espécies possuem o parecer de segurança QPS, sendo 36 espécies da família *Lactobacillaceae*, 3 do gênero *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*), e 5 do gênero *Bifidobacterium* (EFSA, 2022).

Para que sejam considerados probióticos, entre outros requisitos, os microrganismos devem se manter viáveis até o local de ação em dose/efeito conhecidas, portanto, devem resistir às barreiras químicas e biológicas do organismo (Brasil, 2018c). A quantificação dos microrganismos é expressa como unidades formadoras de colônia (UFC) por porção. Um número insuficiente de UFC descaracteriza uma cepa bacteriana como probiótico. O número

mínimo de UFC que necessitam ser administradas para se ter efetivos efeitos na saúde é de 10^9 UFC ou mais (Gibson et al., 2017). No entanto, tem sido documentado que doses inferiores também podem exercer os efeitos benéficos esperados (Grom et al., 2020; Ranadheera et al., 2019). Sendo assim, para a alegação funcional ser utilizada no Brasil, a cepa probiótica deve ser caracterizada e sua dose/efeito específico determinada através de estudos clínicos (Brasil, 2018c).

Esses efeitos benéficos são alcançados devido a mecanismos de ação dos probióticos, como inibição de bactérias patogênicas, produção de bacteriocinas, síntese de micronutrientes, metabolismo de nutrientes para melhora da digestão ou produção de efeitos sistêmicos, alteração do microbioma, mudanças da sinalização para o sistema nervoso, produção contra estresse fisiológico, melhora da função de barreira do epitélio intestinal e imunomodulação, a qual pode ser dependente de contato e/ou mediada por moléculas de superfície, como o ácido lipoteicóico, ou por moléculas secretadas, como ácidos graxos de cadeia curta e bacteriocinas (Chugh; Kamal-Eldin, 2020; Suez et al., 2019). As propriedades biológicas dos probióticos variam de acordo com as cepas e o sucesso ou falha na modulação intestinal ou melhora das condições fisiopatológicas não devem ser consideradas válidas para todas as espécies (Suez et al., 2019).

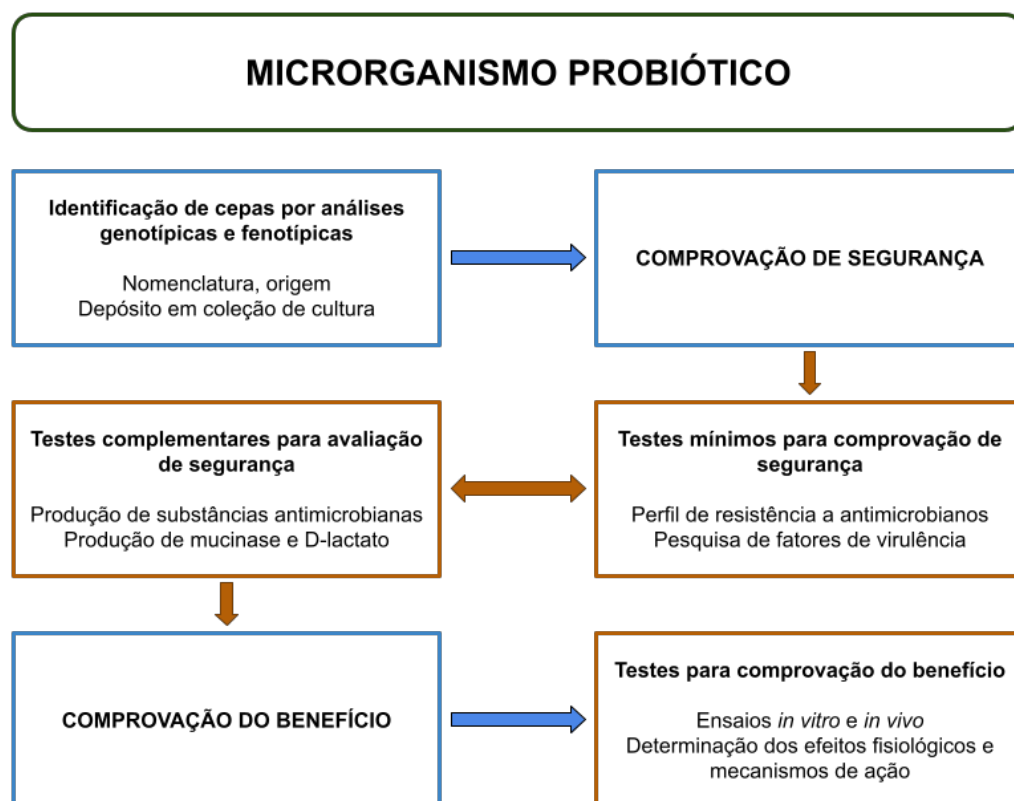
Segundo Markowiak e Ślizewska (2017), a maioria dos microrganismos probióticos utilizados na nutrição humana são espécies pertencentes à família *Lactobacillaceae* (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*) e ao gênero *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*). Além destas, ainda se tem conhecimento de *Escherichia coli* Nissle 1917, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus clausii*. Alguns dos gêneros citados são conhecidos por possuírem espécies patogênicas, como é o caso de *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp. e *Escherichia* sp. Para garantir a segurança da ingestão destes microrganismos, numerosos critérios que avaliam características de segurança, tecnológicas, funcionais e fisiológicas de microrganismos potencialmente probióticos são exigidos para a seleção de cepas adequadas (Dinkçi et al., 2019).

1.5.1 Isolamento e Caracterização de Novas Cepas Probióticas

No Brasil, a RDC Nº 241, de 27 de julho de 2018, dispõe dos requisitos técnicos para comprovação de segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos

(Brasil, 2018c). A avaliação consiste na comprovação da linhagem, da sua segurança e do efeito benéfico à saúde. Para garantir a segurança de uso, o microrganismo deve ser suscetível a pelo menos dois antibióticos, ter ausência de genes de resistência transferíveis, ausência de produção de metabólitos que representem risco à saúde humana, ausência de fatores de virulência e patogenicidade e histórico de uso seguro (Brasil, 2018c). Além deste, há também um documento disponibilizado por Brasil (2021) de efeito recomendatório e instrutivo para petição da avaliação de probióticos em alimentos, o Guia nº 21/2021- versão 2. Segundo ele, a grande parte dos microrganismos conhecidos e usados como probióticos, pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas (Brasil, 2021). A Figura 4 apresenta todas as informações que devem conter em uma petição para avaliação de um microrganismo probiótico para uso em alimentos, segundo o Guia 21/2021.

Figura 4. Comprovações necessárias para avaliação de microrganismo probiótico para uso em alimentos.



Fonte: Adaptado de Guia nº 21/2021- versão 2 (Brasil, 2021).

Algumas cepas potencialmente probióticas podem estar envolvidas em atividades metabólicas danosas ou podem produzir compostos metabólicos tóxicos ao hospedeiro, causar infecções, induzir respostas imunológicas inadequadas em populações vulneráveis ou que possam possuir genes de resistência a antibióticos transferíveis para os patógenos (Daliri et al., 2019). Por esse motivo, testes mínimos devem demonstrar a ausência de genes de resistência a

antibióticos capazes de serem transferíveis horizontalmente ou fatores de virulência que possam causar danos à saúde do consumidor (Brasil, 2021).

A capacidade de adesão aos tecidos humanos e ao trato gastrointestinal é um fator crítico para a virulência de patógenos. Em relação a microrganismos probióticos e bactérias da microbiota intestinal, é uma característica positiva e é um dos critérios na avaliação de novos probióticos, permitindo a colonização e manutenção dos microrganismos no intestino (Casarotti et al., 2017; De Castilho et al., 2019; Dlamini et al., 2019). Os lactobacilos foram associados à presença de genes de virulência relacionados as propriedades de adesão e colonização de *Enterococcus* spp, podendo ser resultado de transferência de genes, os quais geralmente são codificados por genes de plasmídeos conjugativos (Fisher; Phillips, 2009; Madsen et al., 2017). A presença desse gene em BAL é um motivo de preocupação com relação a transferência horizontal de genes de virulência para patógenos oportunistas (Colautti et al., 2022). A gelatinase é uma metaloendopeptidase dependente de zinco considerada um fator de virulência pois contribui para a degradação dos tecidos do hospedeiro (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2017). É codificada pelo gene *gelE* e geralmente é secretada por isolados pertencentes a *E. faecalis* e *E. faecium*, mas também foi encontrada em espécies de lactobacilos (Lopes et al., 2006).

Muitos metabólitos que podem fornecer prejuízos são produzidos pelas bactérias, o qual inclui compostos bioativos como as aminas biogênicas (AB), responsáveis por efeitos adversos responsáveis por síndromes patogênicas (Pessione; Cirrincione, 2016). O efeito tóxico das aminas biogênicas depende do tipo, da sensibilidade individual e do consumo de medicamentos detoxificantes. As aminas biogênicas são classificadas como aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina), alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina) e heterocíclicas (histamina e triptamina). As principais AB produzidas por bactérias ácido lácticas, cepas consideradas probióticas, são a histamina, tendo como aminoácido precursor a histidina, a tiramina (tirosina), 2 – feniletilamina (fenilalanina), cadaverina (lisina) e a putrecina (arginina) (Barbieri et al., 2019). Santamarina-García et al. (2022) estudou a relação entre aminas biogênicas e a composição microbiana presente em queijo de leite cru de ovelha. Oito gêneros de bactérias apresentaram-se como bactérias-chave relacionadas a produção de AB, sendo *Lactobacillus* o único gênero que apresentou várias correlações positivas, sendo fortemente correlacionado as concentrações de tiramina, cadaverina e metilamina. No estudo sobre BAL isolados de leite cru de cabra, realizado por Perin et al. (2017), quatorze cepas de *Lactococcus* e *Enterococcus* foram analisadas com relação a produção de AB, por meio de cromatografia líquida, utilizando padrões de 2-feniletilamina, putrescina, histamina,

cadaverina, tiramina e espermidina, onde foram detectadas concentrações de 2-feniletilamina em quatro espécies e tiramina em doze espécies. A tiramina é uma das principais AB encontradas em queijos de leite cru, já a 2-feniletilamina é encontrada em menores concentrações. Portanto, é importante a seleção adequada de espécies de probióticos que não produzam aminas biogênicas, a fim de evitar seus efeitos tóxicos no organismo ou em alimentos em que as mesmas possam ser adicionadas (Schirone et al., 2022).

O uso de antibióticos como agente de crescimento ou como medida profilática na produção animal é taxado como uma das maiores fontes de consumo indireto de antimicrobianos por humanos. Além desta contaminação, de animais para humanos, o uso indiscriminado de antibióticos também desempenha um papel importante para desenvolvimento de microrganismos resistentes, fato esse que o tornou uma das três maiores ameaças à saúde humana (Das et al., 2020; Wang et al., 2019). Muitas espécies de lactobacilos apresentam uma resistência natural (intrínseca) aos glicopeptídeos e a outros antibióticos como penicilina G, norfloxacin, ciprofloxacina e ofloxacina (Klein et al., 2000). A resistência intrínseca pode funcionar de duas maneiras: ou o probiótico já possui genes de resistência em seu genoma ou não possui o alvo apropriado para os antibióticos. Genes de resistência intrínseca existem nos cromossomos de certos probióticos (espécie, gênero ou acima), e genes de resistência relativamente mais conservados podem ser transferidos para a próxima geração; assim, genes de resistência natural podem ser previstos com antecedência com base nas espécies e homologies de probióticos, não por testes de suscetibilidade a antibióticos (Jose et al., 2014; Kapse et al., 2019). No entanto, probióticos com genes resistentes a antibióticos codificados por plasmídeos e transposons, também conhecidos como genes com resistência adquirida, a partir de transferência horizontal de genes, podem ser transferidos para outros membros do ecossistema microbiano intestinal (Van Schaik, 2015). A transferência horizontal de genes entre bactérias é a transferência de material genético entre células usando conjugação, transformação ou transdução, onde diversas bactérias diferentes podem adaptar-se ao gene transferido, como os genes de resistência aos antibióticos (Nazarian et al, 2018; Li et al., 2020). Essa propriedade é particularmente preocupante porque esses genes resistentes podem ser transferidos para patógenos e dificultar o tratamento antimicrobiano. Muitos estudos mostraram a capacidade das BAL de transferir genes resistentes a antibióticos para bactérias patogênicas (Daliri et al., 2019). A pesquisa de Guo et al. (2017), a qual avaliou 33 espécies de *Lactobacillus* de leite fermentado chinês, detectou genes de resistência a antimicrobianos por PCR, demonstrando que todas eram resistentes à vancomicina, também apresentando genes de resistência intrínseca à ciprofloxacina e tetraciclina. A cepa *Enterococcus durans* KLDS6.0930 estudada por Li et al.

(2018) apresentou um gene de resistência a aminoglicosídeos, e doze genes associados à resistência à beta-lactâmicos, lincosamida, tetraciclina, rifampicina, aminocumarina, trimetoprima e glicopeptídeos. Já Jaimee e Halami (2017) estudaram a respeito das mudanças nos níveis de expressão de mRNA dos genes de resistência a aminoglicosídeos após a indução de gentamicina em *E. faecalis* MCC3063, e concluíram que os padrões de resistência cruzada dos genes são explicados devido a indução de mRNA em concentrações específicas. Os fenótipos de resistência dos probióticos são geralmente avaliados segundo metodologia do Comitê Europeu em Testagem de Suscetibilidade a Antimicrobianos (EUCAST), apresentando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) como a metodologia oficial. Os valores de CIM são determinados a partir de valores informados em documentos internacionais, para determinadas classes de microrganismos. No entanto, alguns microrganismos não são citados nestes documentos, como é o caso da faixa de corte para as BAL e, para isso, o EUCAST fornece um documento com valores de CIM para microrganismos anaeróbios. Neste documento são informados pontos de corte para Benzilpenicilina, meropenem, clindamicina, vancomicina, piperaciclina-tazobactam e metronidazol (EUCAST, 2021). Além deste, Brasil (2021) também indica a utilização de valores de referência fornecidos pela Autoridade Europeia em Segurança de Alimentos (EFSA). As cepas estudadas devem ser susceptíveis a, no mínimo, dois antibióticos (Brasil, 2021). O Quadro 4 apresenta os principais genes de resistência a antimicrobianos e genes de virulência encontrados em espécies de lactobacilos.

A caracterização das cepas de bactérias ácido lácticas é realizada para garantir a sua identificação e segurança da sua aplicação em alimentos ou fármacos. Essa caracterização inicial proporciona uma pré-seleção de cepas possíveis de serem aplicadas, a partir de testes *in vitro*, para posterior realização de testes *in vivo* e depósito do genoma completo da bactéria em coleção de culturas. Com todas as informações favoráveis à sua utilização, a cepa pode ser apresentada ao órgão de saúde, com a intenção de aplicação posterior, a fim de avaliar a sua atuação em diferentes matrizes alimentícias.

Quadro 4. Genes de resistência a antimicrobianos, genes de virulência e espécies de BAL em que são encontrados.

Gene		Sequência (5' – 3')	Exemplos de espécies com presença dos genes	Referência
Antibióticos				
Tetraciclina	<i>tetW</i>	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC GGGCGTATCCACAATGTTAAC	<i>L. amylovorus</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> ,	Thumu; Halami (2012)
	<i>tetO</i>	GCGGAACATTGCATTTGAGGG CTCTATGGACAACCCGACAGAAG	<i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i>	Poyart et al. (2003)
	<i>tetS</i>	CATAGACAAGCCGTTGACC ATGTTTTTGGAACGCCAGAG	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i>	Thumu; Halami (2012)
	<i>tetM</i>	GTGGAGTACTACATTTACGAG GAAGCGGATCACTATCTGAG	<i>L. paracasei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i> ,	Poyart et al. (2003)
	<i>tetK</i>	GTAGGATCTGCTGCATTCCC CACTATTACCTATTGTCGC	<i>L. buchneri</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i>	Poyart et al. (2003)
	<i>tetL</i>	TCGTTAGCGTGCTGTCATTC GTATCCCACCAATGTAGCCG	<i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. salivarius</i>	Thumu; Halami (2012)
Eritromicina	<i>ermB</i>	GAAAAGGTACTCAACCAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	<i>L. helveticus</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i>	Sutcliffe et al. (1996)
	<i>ermA</i>	AAGCGGTAAACCCCTCTGAG TCAAAGCCTGTGCGAATTGG	<i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i>	Jensen et al. (1999)
	<i>ermC</i>	TCAAAACATAATATAGATAAA GCTAATATTGTTTAAATCGTCAA	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i>	Sutcliffe et al. (1996)
	<i>ermT</i>	ATTATTGAGATTGGTTCAGGG GGATGAAAGTATTCTCTAGGGATT	<i>L. reuteri</i>	Tannock et al. (1994)
Clindamicina	<i>lsa</i>	GGCAATCGCTTGTGTTTTAGCG GTGAATCCCATGATGTTGATACC	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i>	Singh; Murray (2005)
Gentamicina	<i>Aac(6')-Ie-aph(2)-Ia</i>	CCAAGAGCAATAAGGGCATAACC ACCCTCAAAAACGTGTGTTGC	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i>	Jiang et al. (2008)
Canamicina	<i>Aph(3')-III</i>	GCCTTTCGCCACCTCACCG GCCGATGTGGATTGCGAAAA	<i>L. helveticus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. casei</i>	Ouoba et al. (2008)
Estreptomicina	<i>aadA</i>	CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC ATCCTTCGGCGCGATTTTG	<i>L. paracasei</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Ouoba et al. (2008)
	<i>aadE</i>	GCAGCGCAATGACATTCTTG ATGGAATTATCCACCTGA	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i>	Ouoba et al. (2008)
Vancomicina	<i>vanA</i>	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	<i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i>	De Castilho et al. (2019)

	<i>vanB</i>	GCTCCGCAGCCTGCATGGACA ACGATGCCGCCATCCTCCTGC	<i>L. curvatus, L. plantarum</i>	De Castilho et al. (2019)
	<i>vanC1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	<i>L. plantarum</i>	De Castilho et al. (2019)
	<i>vanC2</i>	CTCCTACGATTCTCTTGR CGAGCAAGACCTTTAAG	<i>L. curvatus, L. delbrueckii, L. fermentum, L. plantarum</i>	De Castilho et al. (2019)
	<i>vanC2/C3</i>	CGGGGAAGATGGCAGTAT CGCAGGGACGGTGATTTT	<i>L. plantarum</i>	Pieniz et al. (2015)
	<i>vanX</i>	GTCGATTCTCGCTAATCC TCGCGGTAGTCCCACCATTTCGTT	<i>L. brevis, L. fermentum, L. casei, L. plantarum</i>	Liu et al. (2009)
Beta-lactamicos	<i>blaSHV</i>	ATGCGTTATATTCGCCTGTG TTAGCGTTGCCAGTGCTCGA	<i>L. gravesensis, L. buchneri, L. plantarum</i>	Sundsford et al. (2004)
	<i>blaTEM</i>	ATGAGTATTCAACATTTTCGTG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	<i>L. brevis, L. rhamnosus, L. fermentum, L. plantarum</i>	Sundsford et al. (2004)
	<i>blaZ</i>	GCATGRTAACCATCACAWAC ACTTCAACACCTGCTGCTTTC	<i>L. plantarum</i>	Aquilanti et al. (2007)
Ciprofloxacino	<i>gyrA</i>	TTCTCCGATTTCCTCATG AGAAGGGTACGAATGTGG	<i>L. curvatus, L. acidophilus, L. reuteri, L. plantarum, L. casei, L. helveticus</i>	De Toro et al. (2010)
	<i>parC</i>	TGGGTTGAAGCCGGTTCA CAAGACCGTTGGTTCTTTC	<i>L. acidophilus, L. brevis, L. plantarum</i>	De Toro et al. (2010)
Cloranfenicol	<i>cat</i>	CAATCATCTACCCTATGAAT TTAGGTTATTGGGATAAGTTA	<i>L. acidophilus, L. bulgaricus, L. brevis, L. plantarum, L. sakei</i>	Hummel et al. (2007)
	<i>catA</i>	ATAACGTTACTCTCCTATTTTC GGATATGAAATTTATCCCTC	<i>L. plantarum</i>	Rojo-Bezares et al. (2006)
Bacitracina	<i>bcrB</i>	AAAGAAACCGACTGCTGATA GCTTACTTGTATAGCAGAGA	<i>L. plantarum, L. curvatus, L. casei, L. fermentum</i>	De Castilho et al. (2019)
	<i>bcrD</i>	AGGATTCGGCCGAATGGCACTTGATTTTAT GTTTCTTCGCGAAATTGCCGTTATAAGTAA	<i>L. plantarum</i>	De Castilho et al. (2019)
	<i>bcrR</i>	AACAAACAGGGAGCGGCCGCATGGAATTTA TGATGTTCGCGATTTTCATTCCCCTGCTT	<i>L. plantarum, L. casei</i>	De Castilho et al. (2019)
Virulência				
Citolisina	<i>cylA</i>	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	<i>L. curvatus, L. fermentum, L. casei</i>	Zhang et al. (2016)
	<i>cylB</i>	ATTCTACCTATGTTCTGTTA AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	<i>L. paraplantarum, L. paracasei, L. kefir,</i>	Soleymanzadeh et al. (2017)
Adesão	<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	<i>L. plantarum, L. paracasei</i>	Pieniz et al. (2015)

Agregação	<i>agg</i>	AAGAAAAAGTAGACCAAC AACGGCAAGACAAGTAAATA	<i>L. reuteri</i>	Pieniz et al. (2015)
	<i>asa</i>	GATACAAAGCCAATGTGGTTCCT TAAAGAGTCGCCACGTTTCACA	<i>L. plantarum, L. bulgaricus, L. curvatus</i>	Pieniz et al. (2015)
Gelatinase	<i>gelE</i>	TATGACAATGCTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	<i>L. curvatus, L. delbrueckii, L. plantarum, L. casei</i>	Zhang et al. (2016)

Fonte: Adaptado de Colautti et al. (2022).

REFERÊNCIAS

AFSHARI, R.; PILLIDGE, C. J.; DIAS, D. A.; OSBORN, A. M.; GILL, H. Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 33–47, 2 jan. 2020. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>

ANDRADE, B. M.; MARGALHO, L. P.; BATISTA, D. B.; LUCENA, I. O.; KAMIMURA, B. A.; BALTHAZAR, C. F.; BREXÓ, R. P.; PIA, A. K. R.; COSTA, R. A. S.; CRUZ, A. G.; GRANATO, D.; SANT'ANA, A. S.; LUNA, A. S.; DE GOIS, J. S. Chemometric classification of Brazilian artisanal cheeses from different regions according to major and trace elements by ICP-OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 109, p. 104519, 1 jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2022.104519>

AQUILANTI, L.; GAROFALO, C.; OSIMANI, A.; SILVESTRI, G.; VIGNAROLI, C.; CLEMENTI, F. Isolation and Molecular Characterization of Antibiotic-Resistant Lactic Acid Bacteria from Poultry and Swine Meat Products. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 3, p. 557–565, mar. 2007. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.3.557>

ARAGÃO, M. O. P. Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em Queijo Minas Artesanal das microrregiões do Serro e da Serra da Canastra. 2018. **Dissertação** (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.

AUSANI, T. de C.; LOPES, G. V.; COSTA, E. de F.; CORBELLINI, L. G.; CARDOSO, M. Microbiological quality of colonial cheese sold in Porto Alegre-RS. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 2, p. 639, 15 abr. 2019. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n2p639>

BACHMANN, H.-P.; FRÖHLICH-WYDER, M.-T.; JAKOB, E.; ROTH, E.; WECHSLER, D.; BEUVIER, E.; BUCHIN, S. Cheese | Raw Milk Cheeses. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 652–660. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00519-7>

BARBIERI, F.; MONTANARI, C.; GARDINI, F.; TABANELLI, G. Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria: A Review. **Foods**, v. 8, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.3390/FOODS8010017>

BEMFEITO, R. M.; RODRIGUES, J. F.; SILVA, J. G.; ABREU, L. R. Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7886–7897, out. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11056>

BENINCÁ, T.; SANTOS, V. Z.; BERRETA, M. R. S.; SANT'ANNA, V. Análise das Boas Práticas de Fabricação na Qualidade Microbiológica do Queijo Colonial Artesanal. 7º **Simpósio de Segurança Alimentar**, Bento Gonçalves, RS, 27 a 29 de outubro de 2020.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4–7, p. 259–274, jul. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)

BERTOLINO, M.; DOLCI, P.; GIORDANO, M.; ROLLE, L.; ZEPPA, G. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1001–1011, dez. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.060>

BEZERRA, T. K. A.; ARAÚJO, A. R. R.; ARCANJO, N. M. de O.; SILVA, F. L. H. da; QUEIROGA, R. de C. R. do E.; MADRUGA, M. S. Optimization of the HS-SPME-GC/MS technique for the analysis of volatile compounds in caprine Coalho cheese using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 103–110, 1 abr. 2016. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0035>

BIOLCATI, F.; FERROCINO, I.; BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A. The Bacterial and Fungal Microbiota of “Robiola di Roccaverano” Protected Designation of Origin Raw Milk Cheese. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 31 jan. 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.776862>

BLAYA, J.; BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3611–3629, abr. 2018. doi.org/10.3168/jds.2017-13345

BLUMA, A.; CIPROVICA I. Diversity of lactic acid bacteria in raw milk. **Research for rural development**, v.1, p.157-161. 2015.

BLUMA, A.; CIPROVICA I. Non Starter Lactic Acid Bacteria in Raw Milk, Thermally Treated Milk and Swiss Type Cheese. **Research for rural development**, v.1, p.98-101. 2016.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, nº 48, de 11 de março de 1996, seção 1, p. 22.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013. Permissão para maturação inferior de 60 dias, para queijos artesanais. **Diário Oficial da União**, nº 152, de 08 de agosto de 2013, seção 1, p. 19.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, nº 62, de 30 de março de 2017, seção 1, p. 3.

BRASIL. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, nº 114, de 15 de junho de 2018a, seção 1, p. 2.

BRASIL. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Ficam aprovados os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, nº 230, de 30 de novembro de 2018b, seção 1, p. 9.

BRASIL. RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação de segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**, nº 144, de 27 de julho de 2018c, seção 1, p. 97.

BRASIL. Instrução Normativa nº 73, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece o regulamento técnico de boas práticas agropecuárias destinadas aos produtores rurais fornecedores de leite para a fabricação de produtos lácteos artesanais, necessárias à concessão do selo ARTE. **Diário Oficial da União**, nº 251, de 30 de dezembro de 2019a, seção 1, p. 120.

BRASIL. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, nº 138, de 19 de julho de 2019b, seção 1, p. 1.

BRASIL. Guia de Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos. **Guia nº 21/2021** – versão 2, de 05/05/2021. Publicado em: 06 mai. 2021. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/guias#/visualizar/448269>. Acesso em: 01 fev. 2024

BRASIL. Decreto nº 11.099, de 21 de junho de 2022. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019, para dispor sobre a elaboração e a comercialização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, nº 116, de 22 de junho de 2022, seção 1, p. 5.

BUEHLER, A. J.; EVANOWSKI, R. L.; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 8814–8825, 1 nov. 2017. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-12635>

CAMPAGNOLLO, F. B.; PEDROSA, G. T. S.; KAMIMURA, B. A.; FURTADO, M. M.; BAPTISTA, R. C.; NASCIMENTO, H. M.; ALVARENGA, V. O.; MAGNANI, M.; SANT'ANA, A. S. Growth potential of three strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in Frescal and semi-hard artisanal Minas microcheeses: Impact of the addition of lactic acid bacteria with antimicrobial activity. **LWT**, v. 158, p. 113169, mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113169>

CARDOSO, M. F. Identificação e quantificação de fungos em queijo colonial utilizando a região ITS1 do gene ITS. 2021. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2021.

CASAROTTI, S. N.; CARNEIRO, B. M.; TODOROV, S. D.; NERO, L. A.; RAHAL, P.; PENNA, A. L. B. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 289–301, 28 abr. 2017. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1258-2>

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. **LWT**, v. 75, p. 670–676, jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.026>

CHRISTOFF, A. P. 2017. Genômica e sequenciamento de nova geração. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

CHUGH, B.; KAMAL-ELDIN, A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 76–82, abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.02.003>

CLARK, S.; COSTELLO, M.; DRAKE, M. A.; BODYFELT, F. The sensory evaluation of dairy products. **The Sensory Evaluation of Dairy Products**, p. 1–573, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77408-4>

COCOLIN, L.; ERCOLINI, D. Zooming into food-associated microbial consortia: a ‘cultural’ evolution. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 43–50, abr. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.01.003>

COLAUTTI, A. et al. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. **Food Microbiology**, v. 103, p. 103934, 1 maio 2022. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2021.103934>

CORREIA, L.; NONES, J. 2021. **Manual do Departamento Estadual de Inspeção de Produtos de Origem Animal da CIDASC visando a Concessão do Selo ARTE no Estado de Santa Catarina**. Disponível em: <https://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2021/08/atualiza%C3%A7%C3%A3o-manual-selo-arte.docx-1.pdf>. Acesso em: 27 fev. 2023.

COSTA, R. G. B.; SOBRAL, D.; PAULA, J. C. J.; SILVA, H. L. A.; GUIMARÃES, J. T.; CAPPATO, L. P.; ESMERINO, E. A.; VAN DENDER, A. G. F.; ZACARCHENCO, P. B.; CRUZ, A. G. Processamento de queijos. **Processamento de produtos lácteos: Queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

DALIRI, E. B. M.; LEE, B. H.; OH, D. H. Safety of Probiotics in Health and Disease. **The Role of Functional Food Security in Global Health**, p. 603–622, 1 jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813148-0.00034-7>

D’AMICO, D.; DONNELLY, C. W. Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. In: **Cheese**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 573–594. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00022-3>

DANEZIS, G. P.; TSIPLAKOU, E.; PAPPA, E. C.; PAPPAS, A. C.; MAVROMMATIS, A.; SOTIRAKOGLU, K.; GEORGIOU, C. A.; ZERVAS, G. Fatty acid profile and physicochemical properties of Greek protected designation of origin cheeses, implications for authentication. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 9, p. 1741–1753, 11 set. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03527-7>

DAS, D. J.; SHANKAR, A.; JOHNSON, J. B.; THOMAS, S. Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic Lactobacillus. **Nutrition**, v. 69, p. 110567, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2019.110567>

DE CASTILHO, N. P. A.; NERO, L. A.; TODOROV, S. D. Molecular screening of beneficial and safety determinants from bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal calabresa. **Letters in Applied Microbiology**, p. lam.13194, 18 jul. 2019. <https://doi.org/10.1111/lam.13194>

DE FILIPPIS, F.; PELLEGRINI, N.; LAGHI, L.; GOBBETTI, M.; ERCOLINI, D. Unusual sub-genus associations of faecal *Prevotella* and *Bacteroides* with specific dietary patterns. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 57, 21 dez. 2016. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0202-1>

DE FILIPPIS, F.; PARENTE, E.; ERCOLINI, D. Recent Past, Present, and Future of the Food Microbiome. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 589–608, 25 mar. 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012312>

DE TORO, M.; ROJO-BEZARES, B.; VINUÉ, L.; UNDABEITIA, E.; TORRES, C.; SÁENZ, Y. In vivo selection of *aac*(6')-Ib-cr and mutations in the *gyrA* gene in a clinical qnrS1-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 1945–1949, set. 2010. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq262>

DINKÇI, N.; AKDENİZ, V.; AKALIN, A. S. Survival of probiotics in functional foods during shelf life. **Food Quality and Shelf Life**, p. 201–233, 1 jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00006-9>

DLAMINI, Z. C.; LANGA, R. L. S.; AIYEGORO, O. A.; OKOH, A. I. Safety Evaluation and Colonisation Abilities of Four Lactic Acid Bacteria as Future Probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 397–402, 15 jun. 2019. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9430-y>

DORIGON, C. Mercados de produtos coloniais da região oeste de Santa Catarina: em construção. 2008. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Produção) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

EFSA. European Food Safety Authority. (2022). **Qualified presumption of safety (QPS)**. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps>. Acesso em: 09 fev. 2023.

ERHARDT, M. M.; OLIVEIRA, W. de C.; FRÖDER, H.; MARQUES, P. H.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; RICHARDS, N. S. P. dos S. Lactic Bacteria in Artisanal Cheese: Characterization through Metagenomics. **Fermentation**, v. 9, n. 1, p. 41, 3 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION9010041/S1>

ERKUS, O.; DE JAGER, V. C.; SPUS, M.; VAN ALLEN-BOERRIGTER, I. J.; VAN RIJSWIJCK, I. M.; HAZELWOOD, L.; JANSSEN, P. W.; VAN HIJUM, S. A.; KLEEREBEZEM, M.; SMID, E. J. Multifactorial diversity sustains microbial community stability. **The ISME Journal**, v. 7, n. 11, p. 2126–2136, 4 nov. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.027>

EUCAST. **Antimicrobial susceptibility tests on groups of organisms or agents for which there are no EUCAST breakpoints**. EUCAST, 2021.

FALARDEAU, J.; KEENEY, K.; TRMČIĆ, A.; KITTS, D.; WANG, S. Farm-to-fork profiling of bacterial communities associated with an artisan cheese production facility. **Food microbiology**, v. 83, p. 48–58, 1 out. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.002>

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization. 2023. **Crops and livestock products**. Disponível em: < <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> >. Acesso em: 03 abr. 2023.

FDA. Food and Drug Administration. 2022. **Generally Recognized as Safe (GRAS)**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>>. Acesso em: 16 mar. 2023.

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. p. 27-64.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749–1757, 1 jun. 2009. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. Pathogens in Cheese and Foodborne Illnesses. **Fundamentals of Cheese Science**, p. 681–713, 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_19

FREIRE, T. T.; SILVA, A. L. T. e; FERREIRA, B. K. O.; SANTOS, T. M. dos. Lactic acid bacteria its characteristics and importance: review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e513101119964–e513101119964, 7 set. 2021. <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I11.19964>

FREITAS, M. P. Avaliação microbiológica de queijos artesanais produzidos na cidade de Taió, Santa Catarina. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 4, n. 2, p. 103–114, 15 dez. 2015. doi.org/10.24302/sma.v4i2.869

GAN, H. H.; YAN, B.; LINFORTH, R. S. T.; FISK, I. D. Development and validation of an APCI-MS/GC–MS approach for the classification and prediction of Cheddar cheese maturity. **Food Chemistry**, v. 190, p. 442–447, 1 jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.05.096>

GEZGINC, Y.; KARABEKMEZ-ERDEM, T.; TATAR, H. D.; DAĞGEÇEN, E. C.; AYMAN, S.; AKYOL, İ. Metagenomics and volatile profile of Turkish artisanal Tulum cheese microbiota. **Food Bioscience**, v. 45, p. 101497, 1 fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.101497>

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 14 jun. 2017. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M.; DI CAGNO, R.; MANCINI, L.; FOX, P. F. Pros and

cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 167–178, out. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.016>

GONZALES-BARRON, U.; GONÇALVES-TENÓRIO, A.; RODRIGUES, V.; CADAVEZ, V. Foodborne pathogens in raw milk and cheese of sheep and goat origin: a meta-analysis approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 18, p. 7–13, 1 dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2017.10.002>

GROM, L. C.; COUTINHO, N. M.; GUIMARÃES, J. T.; BALTHAZAR, C. F.; SILVA, R.; ROCHA, R. S.; FREITAS, M. Q.; DUARTE, M. C. K. H.; PIMENTEL, T. C.; ESMERINO, E. A.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Probiotic dairy foods and postprandial glycemia: A mini-review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, p. 165–171, jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.012>

GUO, H.; PAN, L.; LI, L.; LU, J.; KWOK, L.; MENGHE, B.; ZHANG, H.; ZHANG, W. Characterization of Antibiotic Resistance Genes from *Lactobacillus* Isolated from Traditional Dairy Products. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 3, p. 724–730, 1 mar. 2017. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13645>

GUPTA, A. K.; GUPTA, U. D. Next generation sequencing and its applications. **Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation**, p. 395–421, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00018-5>

HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 1, p. 18–31, 2011. <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>

HANSEN, C. O impacto das NSLAB na qualidade dos queijos. **Indústria de Laticínios**, v.21, p.24-25, 2017.

HAYALOGLU, A. A. Cheese: Microbiology of Cheese. **Reference Module in Food Science**, 1 jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00675-2>

HERMAN-LARA, E.; BOLÍVAR-MORENO, D.; TOLEDO-LOPEZ, V. M.; CUEVAS-GLORY, L. F.; LOPE-NAVARRETE, M. C.; BARRON-ZAMBRANO, J. A.; DÍAZ-RIVERA, P.; RAMÍREZ-RIVERA, E. de J. Minerals multi-element analysis and its relationship with geographical origin of artisanal Mexican goat cheeses. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 517–525, 9 maio 2019. <https://doi.org/10.1590/FST.23918>

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

HUMMEL, A. S.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P. Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. **Applied and**

Environmental Microbiology, v. 73, n. 3, p. 730–739, fev. 2007.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02105-06>

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. **Senso Agropecuário 2017 | Resultados definitivos | Brasil**. Disponível em: <
https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pdf/producao.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2023.

ILLUMINA. 2022a. **MiSeq System**. Disponível em:
 <<https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/miseq-system-data-sheet-m-gl-00006/miseq-data-sheet-m-gl-00006.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

ILLUMINA. 2022b. **MiniSeq Sequencing System**. Disponível em:
 <<https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/miniseq-system-spec-sheet-m-na-00006/miniseq-system-spec-sheet-m-na-00006.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

ILLUMINA. 2022c. **NextSeq 1000 & NextSeq 2000 Sequencing System**. Disponível em:
 <<https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/nextseq-1000-2000-spec-sheet-m-na-00008/nextseq-1000-2000-spec-sheet-m-na-00008.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

ILLUMINA. 2022d. **NovaSeq X and NovaSeq X Plus Sequencing System**. Disponível em:
 <<https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/novaseq-x-series-spec-sheet-m-us-00197/novaseq-x-series-specification-sheet-m-us-00197.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

ILLUMINA. 2022e. **HiSeq 3000/HiSeq 4000 Sequencing System**. Disponível em:
 <<https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/hiseq-3000-4000-specification-sheet-770-2014-057.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

ISIDORIO, W. R. Caracterização da microbiota de queijos artesanais provenientes da Serra da Canastra – MG e da cultura iniciadora natural utilizada em sua produção. 2019.
Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

IOANNIDOU, M. D.; MAGGIRA, M.; SAMOURIS, G. Physicochemical Characteristics, Fatty Acids Profile and Lipid Oxidation during Ripening of Graviera Cheese Produced with Raw and Pasteurized Milk. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2138, 19 jul. 2022.
<https://doi.org/10.3390/foods11142138>

ISSA, A. T.; TAHERGORABI, R. Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract: Microbial Composition of Milk. **Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases: Foods, Nutrients, and Dietary Supplements**, p. 265–275, 1 jan. 2019.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814468-8.00022-3>

JAIMEE, G.; HALAMI, P. M. Conjugal transfer of aac(6')Ie-aph(2'')Ia gene from native species and mechanism of regulation and cross resistance in *Enterococcus faecalis* MCC3063

by real time-PCR. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 546–553, 1 set. 2017. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.07.049>

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 7. ed. New York: Springer, 2005, 790p.

JENSEN, L. B.; FRIMODT-MOLLER, N.; AARESTRUP, F. M. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 151–158, jan. 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13368.x>

JIANG, Y.; ZHOU, Z.; QIAN, Y.; WEI, Z.; YU, Y.; HU, S.; LI, L. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1003–1006, maio 2008. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn063>

JONNALA, B. R. Y.; MCSWEENEY, P. L. H.; SHEEHAN, J. J.; COTTER, P. D. Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 23 maio 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>

JOSE, N. M.; BUNT, C. R.; HUSSAIN, M. A. Implications of Antibiotic Resistance in Probiotics. **Food Reviews International**, v. 31, n. 1, p. 52–62, 2 jan. 2014. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961075>

JOYNER, H. S.; FRANCIS, D.; LUZZI, B.; JOHNSON, J. R. The effect of storage temperature on blue cheese mechanical properties. **Journal of Texture Studies**, v. 49, n. 3, p. 309–319, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1111/JTXS.12301>

KAMILARI, E.; TSALTAS, D.; STANTON, C.; ROSS, R. P. Metataxonomic Mapping of the Microbial Diversity of Irish and Eastern Mediterranean Cheeses. **Foods**, v. 11, n. 16, p. 2483, 1 ago. 2022. <https://doi.org/10.3390/FOODS11162483/S1>

KAMIMURA, B. A.; MAGNANI, M.; LUCIANO, W. A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; PIMENTEL, T. C.; ALVARENGA, V. O.; PELEGRINO, B. O.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 1 set. 2019a. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12486>

KAMIMURA, B. A.; DE FILIPPIS, F.; SANT'ANA, A. S.; ERCOLINI, D. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, p. 40–49, 1 jun. 2019b. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.12.014>

KAMIMURA, B. A.; CABRAL, L.; NORONHA, M. F.; BAPTISTA, R. C.; NASCIMENTO, H. M.; SANT'ANA, A. S. Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. **Food Microbiology**, v. 89, p. 103453, ago. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103453>

KAPSE, N. G.; ENGINEER, A. S.; GOWDAMAN, V.; WAGH, S.; DHAKEPHALKAR, P. K. Functional annotation of the genome unravels probiotic potential of *Bacillus coagulans*

HS243. **Genomics**, v. 111, n. 4, p. 921–929, 1 jul. 2019.
<https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2018.05.022>

KATERINOPOULOU, K.; KONTOGEORGOS, A.; SALMAS, C. E.; PATAKAS, A.; LADAVOS, A. Geographical Origin Authentication of Agri-Food Products: A Review. **Foods**, v. 9, n. 4, p. 489, 13 abr. 2020. <https://doi.org/10.3390/FOODS9040489>

KAZOU, M. et al. Microbial Flora. **Handbook of Dairy Foods Analysis**. 2. ed: Taylor & Francis, 2021. cap. 32. p. 673-697.

KHATTAB, A. R.; GUIRGUIS, H. A.; TAWFIK, S. M.; FARAG, M. A. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 343–360, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>

KIRMACI, H. A.; HAYALOĞLU, A. A.; ÖZER, H. B.; ATASOY, A. F.; LEVENT, O. Effects of Wild-Type Starter Culture (Artisanal Strains) on Volatile Profile of Urfa Cheese Made from Ewe Milk. **International Journal of Food Properties**, 18(9), 1915–1929, 2015. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.942782>

KLEIN, G.; HALLMANN, C.; CASAS, I. A.; ABAD, J.; LOUWERS, J.; REUTER, G. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. **Journal of applied microbiology**, v. 89, n. 5, p. 815–824, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01187.x>

KOPYLOVA, E.; NAVAS-MOLINA, J. A.; MERCIER, C.; XU, Z. Z.; MAHÉ, F.; HE, Y.; ZHOU, H.-W.; ROGNES, T.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R. (2016). Open-Source Sequence Clustering Methods Improve the State Of the Art. **mSystems**, vol. 1, n. 1, 23 fev. 2016. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00003-15>

LI, B.; ZHAN, M.; EVIVIE, S. E.; JIN, D.; ZHAO, L.; CHOWDHURY, S.; SARKER, S. K.; HUO, G.; LIU, F. Evaluating the safety of potential probiotic *Enterococcus durans* KLDS6.0930 using whole genome sequencing and oral toxicity study. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1943, 21 ago. 2018. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01943/BIBTEX>

LI, T.; TENG, D.; MAO, R.; HAO, Y.; WANG, X.; WANG, J. A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 136, p. 109571, 1 out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109571>

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. 1, 266-272, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000100037>

LIU, C.; ZHANG, Z.-Y.; DONG, K.; YUAN, J.-P.; GUO, X.-K Antibiotic Resistance of Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Marketed Foods and Drugs. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 22, n. 5, p. 401–412, out. 2009.

[https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(10\)60018-9](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(10)60018-9)

LOPES, M. de F. S.; SIMÕES, A. P.; TENREIRO, R.; MARQUES, J. J. F.; CRESPO, M. T. B. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci.

International Journal of Food Microbiology, v. 112, n. 3, p. 208–214, dez. 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.004>

MADSEN, K. T.; SKOV, M. N.; GILL, S.; KEMP, M. Virulence Factors Associated with Enterococcus Faecalis Infective Endocarditis: A Mini Review. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 31 mar. 2017. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010001>

MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B.; KOLSTRUP, C. Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3866–3875, 2006. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(06\)72429-8](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(06)72429-8)

MAREZE, J.; RAMOS-PEREIRA, J.; SANTOS, J. A.; BELOTI, V.; LÓPEZ-DÍAZ, T. M. Identification and characterisation of lactobacilli isolated from an artisanal cheese with antifungal and antibacterial activity against cheese spoilage and mycotoxigenic *Penicillium* spp. **International Dairy Journal**, v. 130, p. 105367, 1 jul. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2022.105367>

MARGALHO, L. P.; KAMIMURA, B. A.; PIMENTEL, T. C.; BALTHAZAR, C. F.; ARAUJO, J. V. A.; SILVA, R.; CONTE-JUNIOR, C. A.; RAICES, R. S. L.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. A large survey of the fatty acid profile and gross composition of Brazilian artisanal cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 101, p. 103955, 1 ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2021.103955>

MARKOWIAK, P.; ŚLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, 15 set. 2017. <https://doi.org/10.3390/NU9091021>

MATARAGAS, M.; ALESSANDRIA, V.; FERROCINO, I.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. A bioinformatics pipeline integrating predictive metagenomics profiling for the analysis of 16S rDNA/rRNA sequencing data originated from foods. **Food Microbiology**, v. 76, p. 279–286, dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.009>

MATERA, J.; LUNA, A. S.; BATISTA, D. B.; PIMENTEL, T. C.; MORAES, J.; KAMIMURA, B. A.; FERREIRA, M. V. S.; SILVA, H. L. A.; MATHIAS, S. P.; ESMERINO, E. A.; FREITAS, M. Q.; RAICES, R. S. L.; QUITÉRIO, S. L.; SANT'ANA, A. S.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Brazilian cheeses: A survey covering physicochemical characteristics, mineral content, fatty acid profile and volatile compounds. **Food Research International**, v. 108, p. 18–26, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.03.014>

MAYO, B.; RACHID, C.; ALEGRIA, A.; LEITE, A.; PEIXOTO, R.; DELGADO, S. Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology. **Current Genomics**, v. 15, n. 4, p. 293–309, 31 jul. 2014. <https://doi.org/10.2174/1389202915666140616233211>

MCSWEENEY, P. L. H. Cheese | Biochemistry of Cheese Ripening. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 667–674. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407->

4.00080-7

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. London, UK: Academic Press, 2017. p.379–387. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80073-3](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80073-3)

MINAS GERAIS. 2022. **Raio X: no dia mundial do queijo, conheça os números da produção em Minas**. Disponível em: <http://www.agricultura.mg.gov.br/index.php/programa-alem-da-fronteira/story/4734-dia-mundial-doqueijo#:~:text=De%20acordo%20com%20o%20Sindicato,de%2076%20milh%C3%B5es%20de%20d%C3%B3lares>. Acesso em: 25 fev. 2023.

MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; DELBES-PAUS, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N.; BERTHIER, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 136–154, 2 maio 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>

MYAZAKI, N. L.; CARDOSO, M. MIOTTO, M. REZZADORI, K.; VERRUCK, S. Potencial da identificação bacteriana em queijos artesanais através de metagenômica. **Inovação, Gestão e Sustentabilidade na Agroindústria – Volume 02**. [s.l.] Instituto Internacional Despertando Vocações, 2021. p. 439–455. <https://doi.org/10.31692/978-65-88970-18-8.439-455>

NASCIMENTO, L. C. S. Seleção de novas linhagens de bactérias ácido-láticas probióticas e aplicação de *E. faecium* em leite. 2017. **Tese** (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto – SP. 2017.

NAVIGIRE, G. S.; GOEL, N.; SAWHNEY, G.; SHARMA, M.; KAUSHIK, P.; MOHANTA, Y. K.; MOHANTA, T. K.; AL-HARRASI, A. Analysis and Interpretation of metagenomics data: an approach. **Biological Procedures Online**, v. 24, n. 1, p. 18, 19 nov. 2022. <https://doi.org/10.1186/s12575-022-00179-7>

NAZARIAN, P.; TRAN, F.; BOEDICKER, J. Q. Modeling multispecies gene flow dynamics reveals the unique roles of different horizontal gene transfer mechanisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. DEC, p. 2978, 4 dez. 2018. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02978/BIBTEX>

NELLI, A.; VENARDOU, B.; SKOUFOS, I.; VOIDAROU, C. (Chrysa); LAGKOUVARDOS, I.; TZORA, A. An Insight into Goat Cheese: The Tales of Artisanal and Industrial Gidotyri Microbiota. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 123, 3 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11010123/S1>

NICCUM, B. A.; KASTMAN, E. K.; KFOURY, N.; ROBBAT, A.; WOLFE, B. E. Strain-Level Diversity Impacts Cheese Rind Microbiome Assembly and Function. **mSystems**, v. 5, n. 3, 30 jun. 2020. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00149-20>

OAKLEY, B. B.; GONZALEZ-ESCALONA, N.; MOLINA, M. 12. Molecular Typing and Differentiation. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association, 2015. <https://doi.org/10.2105/mbef.0222.017>

O'DONNELL, S. T.; ROSS, R. P.; STANTON, C. The Progress of Multi-Omics Technologies: Determining Function in Lactic Acid Bacteria Using a Systems Level Approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 28 jan. 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03084>

OLIVEIRA, L. G. Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de queijo Minas artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG. 2014. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

OLIVEIRA, M.; RAMOS, S.; DELERUE-MATOS, C.; MORAIS, S. Espresso beverages of pure origin coffee: Mineral characterization, contribution for mineral intake and geographical discrimination. **Food Chemistry**, v. 177, p. 330–338, 15 jun. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.061>

OUOBA, L. I. I.; LEI, V.; JENSEN, L. B. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 217–224, jan. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.018>

OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. 2023a. **MinION**. Disponível em: <https://nanoporetech.com/products/minion#tabs-0=mk1b>. Acesso em: 27 fev. 2023.

OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. 2023b. **GridION**. Disponível em: <https://nanoporetech.com/products/gridion>. Acesso em: 27 fev. 2023.

OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. 2023c. **MinION**. Disponível em: <https://nanoporetech.com/products/promethion>. Acesso em: 27 fev. 2023.

PANTHI, R. R.; JORDAN, K. N.; KELLY, A. L.; SHEEHAN, J. J. Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition**, v. 1, p. 23–50, 1 jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00002-8>

PARENTE, E.; COGAN, T. M.; POWELL, I. B. Starter Cultures: General Aspects. **Cheese**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 201–226. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>

PEREIRA, E. B. Avaliação de queijos Colonial e Colonial Imbriago submetidos a diferentes tempos de produção e maturação. 2014. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2014.

PEREIRA, M. T.; SANTOS, J. S.; SANTANA, E. H. W. Importância das Bactérias Ácido Lácticas e não Starter (NSLAB) na Tecnologia de Produção dos Derivados Lácteos. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e Da Saúde**, 24(4), 348–352. 2020. <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2020V24N4P348-352>

PEREIRA, F. A. O. Queijo colonial artesanal do sudoeste do Paraná: identificação de compostos voláteis e alterações químicas e físicas durante a maturação. 2021. **Dissertação**

(Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2021.

PERIN, L. M.; BELVISO, S.; DAL BELLO, B.; NERO, L. A.; COCOLIN, L. Technological Properties and Biogenic Amines Production by Bacteriocinogenic Lactococci and Enterococci Strains Isolated from Raw Goat's Milk. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 1, p. 151–157, 1 jan. 2017. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-267>

PESSIONE, E.; CIRRINCIONE, S. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: Encrypted peptides and biogenic amines. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 876, 9 jun. 2016. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00876/BIBTEX>

PIENIZ, S.; DE MOURA, T. M.; CASSENEGO, A. P. V.; ANDREAZZA, R.; FRAZZON, A. P. G.; CAMARGO, F. A. de O.; BRANDELLI, A. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated Enterococcus durans with potential probiotic effect. **Food Control**, v. 51, p. 49–54, 1 maio 2015. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2014.11.012>

POYART, C.; JARDY, L.; QUESNE, G.; BERCHÉ, P.; TRIEU-CUOT, P. Genetic Basis of Antibiotic Resistance in *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated in a French Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 794–797, fev. 2003. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.794-797.2003>

QUIJADA, N. M.; SCHMITZ-ESSER, S.; ZWIRZITZ, B.; GUSE, C.; STRACHAN, C. R.; WAGNER, M.; WETZELS, S. U.; SELBERHERR, E.; DZIECIOL, M. Austrian raw-milk hard-cheese ripening involves successional dynamics of non-inoculated bacteria and fungi. **Foods**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9121851>

RACCACH, M. *Pediococcus*. **Encyclopedia of Food Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00247-0>

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; BAINES, S. K.; BALTHAZAR, C. F.; CRUZ, A. G.; ESMERINO, E. A.; FREITAS, M. Q.; PIMENTEL, T. C.; WITTEWER, A. E.; NAUMOVSKI, N.; GRAÇA, J. S.; SANT'ANA, A. S.; AJLOUNI, S.; VASILJEVIC, T. Probiotics in Goat Milk Products: Delivery Capacity and Ability to Improve Sensory Attributes. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 4, p. 867–882, 9 jul. 2019. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12447>

RAYMOND-FLEURY, A.; LESSARD, M.-H.; CHAMBERLAND, J.; POULIOT, Y.; DUGAT-BONY, E.; TURGEON, S. L.; ST-GELAIS, D.; LABRIE, S. Analysis of Microbiota Persistence in Quebec's Terroir Cheese Using a Metabarcoding Approach. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1381, 9 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071381>

ROJO-BEZARES, B.; SÁENZ, Y.; POETA, P.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 234–240, out. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.007>

ROLDAN, B. B.; AMBROSINI, L. B.; BREMM, C.; KROEFF, D. R. Characterization of colonial cheese: appreciation a traditional product from southern Brazil. **Ciência Rural**, v. 53, n. 9, p. 2023, 17 fev. 2023. <https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20220277>

SANTA CATARINA. **Portaria SAR nº 25/2020, de 20 de agosto de 2020**. Institui o Comitê Estadual do Selo ARTE (CESARTE). Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2020/08/Portaria-SAR-25-2020-CESARTE.pdf>. Acesso em: 27 fev. 2023.

SANTA CATARINA. Lei nº 18.250, de 10 de novembro de 2021. Dispõe sobre os requisitos exigidos para a elaboração do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Colonial Artesanal de Leite Cru e adota outras providências. **Diário Oficial do Estado**, nº 21.644, de 11 de novembro de 2021, p. 2.

SANTA CATARINA. 2023. **Cadastro de produtos com Selo ARTE no estado de Santa Catarina**. Disponível em: https://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2023/01/Base-De-Dados-Selo-Arte-SC_JAN23.xlsx-Planilhas-Google-2.pdf. Acesso em: 16 fev. 2023.

SANTAMARINA-GARCÍA, G.; AMORES, G.; LÓPEZ DE ARMENTIA, E.; HERNÁNDEZ, I.; VIRTO, M. Relationship between the Dynamics of Gross Composition, Free Fatty Acids and Biogenic Amines, and Microbial Shifts during the Ripening of Raw Ewe Milk-Derived Idiazabal Cheese. **Animals**, v. 12, n. 22, p. 3224, 1 nov. 2022. <https://doi.org/10.3390/ANI12223224/S1>

SANT'ANNA, F. M.; WETZELS, S. U.; CICCIO, S. H. S.; FIGUEIREDO, R. C.; SALES, G. A.; FIGUEIREDO, N. C.; NUNES, C. A.; SCHMITZ-ESSER, S.; MANN, E.; WAGNER, M.; SOUZA, M. R. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**, v. 82, p. 349–362, 1 set. 2019. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2019.02.016>

SANTOS, S. Dos; RESSUTTE, J.; BÁNKUTI, S.; BÁNKUTI, F.; POZZA, M.; MADRONA, G. S. Características tecnológicas, de qualidade e potencialidades da cadeia produtiva de queijo colonial na região Sul do Brasil: uma revisão. **FTT Journal of Engineering and Business**, v. 1, n. 2, 24 out. 2017.

SCHIRONE, M.; VISCIANO, P.; CONTE, F.; PAPARELLA, A. Formation of biogenic amines in the cheese production chain: Favours and hindering factors. **International Dairy Journal**, v. 133, p. 105420, 1 out. 2022. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2022.105420>

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1501–1506, mar. 2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1501-1506.2005>

SCHUG, T. S.; GANDRA, T. K. V.; GANDRA, E. A. *Listeria monocytogenes* em queijos coloniais comercializados em feiras livres na cidade de Pelotas – RS. **8ª Semana Integrada UFPEL 2022/XXIV ENPÓS – Encontro de Pós-Graduação**. Pelotas – RS, 2022.

SHEN, C. H. Techniques in Sequencing. **Diagnostic Molecular Biology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 277–302. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00011-0>

SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. Differences in the *Enterococcus faecalis* lsa locus that influence susceptibility to quinupristin-dalfopristin and clindamycin. **Antimicrobial Agents**

and Chemotherapy, v. 49, n. 1, p. 32–39, jan. 2005. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.32-39.2005>

SOLEYMANZADEH, N. et al. Incidence of virulence determinants and antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from iranian traditional fermented camel milk (Chal). **Journal of Food Biosciences and Technology**, vol. 7, n. 2, p. 1-8, 2017.

SOMERVILLE, V.; LUTZ, S.; SCHMID, M.; FREI, D.; MOSER, A.; IRMLER, S.; FREY, J. E.; AHRENS, C. H. Long-read based de novo assembly of low-complexity metagenome samples results in finished genomes and reveals insights into strain diversity and an active phage system. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 143, 25 dez. 2019.
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1500-0>

SPYRELLI, E.; STAMATIOU, A.; TASSOU, C.; NYCHAS, G.-J.; DOULGERAKI, A. Microbiological and Metagenomic Analysis to Assess the Effect of Container Material on the Microbiota of Feta Cheese during Ripening. **Fermentation**, v. 6, n. 1, p. 12, 18 jan. 2020. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010012>

SUÁREZ, N.; WECKX, S.; MINAHK, C.; HEBERT, E. M.; SAAVEDRA, L. Metagenomics-based approach for studying and selecting bioprotective strains from the bacterial community of artisanal cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 335, p. 108894, 16 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108894>

SUEZ, J.; ZMORA, N.; SEGAL, E.; ELINAV, E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature Medicine** **2019** **25**:5, v. 25, n. 5, p. 716–729, 6 maio 2019.
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>

SUNDSFJORD, A.; SIMONSEN, G. S.; HALDORSEN, B. C.; HAAHEIM, H.; HJELMEVOLL, S.-O.; LITTAUER, P.; DAHL, K. H. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. **APMIS**, v. 112, n. 11–12, p. 815–837, dez. 2004.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1208.x>

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2562–2566, nov. 1996. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.11.2562>

TANNOCK, G. W.; LUCHANSKY, J. B.; MILLER, L.; CONNELL, H.; THODE-ANDERSEN, S.; MERCER, A. A.; KLAENHAMMER, T. R. Molecular Characterization of a Plasmid-Borne (pGT633) Erythromycin Resistance Determinant (ermGT) from *Lactobacillus reuteri* 100-63. **Plasmid**, v. 31, n. 1, p. 60–71, jan. 1994.
<https://doi.org/10.1006/plas.1994.1007>

THERMOFISHER SCIENTIFIC. 2022a. **Ion GeneStudio S5 series**. Disponível em: <<http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CSD/Specification-Sheets/PG1720-PJT2769-COL22253-P-on-GeneStudio-S5-Spec-Sheet-Global-FLR.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. 2022b. **Ion Proton System Specifications**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/pt/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow>>

sequencing-run-sequence/ion-proton-system-for-next-generation-sequencing/ion-proton-system-specifications.html>. Acesso em: 27 fev. 2023.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. 2022c. **Ion PGM Dx System**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1716-PJT2366-COL31810-RUSH-NPI-PGM-Dx-Update-Spec-Sheet-Global-FHR.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. 2022d. **Instruments for Sanger Sequencing and Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/pt/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-sequencing-technology-accessories.html>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

THUMU, S. C.; HALAMI, P. M. Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 4, p. 541–551, 1 nov. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9749-4>

TILOCCA, B.; COSTANZO, N.; MORITTU, V. M.; SPINA, A. A.; SOGGIU, A.; BRITTI, D.; RONCADA, P.; PIRAS, C. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, 6 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>

TOMAR, O.; AKARCA, G.; VELI, G. Ö. K.; ÇAĞLAR, M. Y. The effects of packaging materials on the fatty acid composition, organic acid content, and texture profiles of Tulum cheese. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 10, p. 3134–3140, 1 out. 2020. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15404>

VAN SCHAIK, W. The human gut resistome. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1670, p. 20140087, 2015. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2014.0087>

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; ZHU, X. The Sequence of the Human Genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1304–1351, 16 fev. 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>

VERCE, M.; DE VUYST, L.; WECKX, S. Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel *Oenococcus* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 13 mar. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>

VERRAES, C.; VLAEMYNCK, G.; VAN WEYENBERG, S.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G.; SINDIC, M.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 50, p. 32–44, nov. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.05.011>

WALSH, A. M.; CRISPIE, F.; CLAEISSON, M. J.; COTTER, P. D. Translating Omics to Food Microbiology. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 113–134, 28 fev. 2017. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-030216-025729>

WANG, K.; ZHANG, H.; FENG, J.; MA, L.; FUENTE-NÚÑEZ, C. de la; WANG, S.; LU, X. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 1, p. 100006, dez. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2019.100006>

WESTCOTT, S. L.; SCHLOSS, P. D. De novo clustering methods outperform reference-based methods for assigning 16S rRNA gene sequences to operational taxonomic units. **PeerJ**, v. 3, p. e1487, 8 dez. 2015. <https://doi.org/10.7717/peerj.1487>

WILKINSON, J.; CERDAN, C.; DORIGON, C. Geographical Indications and “Origin” Products in Brazil – The Interplay of Institutions and Networks. **World Development**, v. 98, p. 82–92, out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2015.05.003>

WOJTYNIAK, K.; SZAJEWSKA, H. Systematic review: probiotics for functional constipation in children. **European Journal of Pediatrics**, v. 176, n. 9, p. 1155–1162, 1 set. 2017. <https://doi.org/10.1007/S00431-017-2972-2>

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P.-Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 135, 22 dez. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>

YVON, M.; THIROUIN, S.; RIJNEN, L.; FROMENTIER, D.; GRIPON, J. C. An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 414–419, fev. 1997. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.414-419.1997>

ZACARCHENCO, P. B.; TRENTO, F.K.H.S.; SPADOTI, L.M.; GALLINA, D.A.; SILVA-ALVES, A.T. Bolo e Leveduras em Queijos. **Revista Leite e Derivados**. São Paulo, 2011; 29: 92-99.

ZAGO, M.; BARDELLI, T.; ROSSETTI, L.; NAZZICARI, N.; CARMINATI, D.; GALLI, A.; GIRAFFA, G. Evaluation of bacterial communities of Grana Padano cheese by DNA metabarcoding and DNA fingerprinting analysis. **Food Microbiology**, v. 93, p. 103613, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2020.103613>

ZHANG, F.; JIANG, M.; WAN, C.; CHEN, X.; CHEN, X.; TAO, X.; SHAH, N. P.; WEI, H. Screening probiotic strains for safety: Evaluation of virulence and antimicrobial susceptibility of enterococci from healthy Chinese infants. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4282–4290, 1 jun. 2016. <https://doi.org/10.3168/JDS.2015-10690>

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M. A. P.; HARRIS, H. M. B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P. W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G. E.; GÄNZLE, M. G.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004107>

ZOTTA, T.; RICCIARDI, A.; CONDELLI, N.; PARENTE, E. Metataxonomic and

metagenomic approaches for the study of undefined strain starters for cheese manufacture.
Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 62, n. 14, p. 3898–3912, 2022.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1870927>

CAPÍTULO 2

Análise Metataxonômica e Composição Química do Queijo Colonial Artesanal (QCA) do Sul do Brasil: Explorando a Diversidade Microbiana e os Aspectos Bioquímicos da Maturação

Análise Metataxonômica e Composição Química do Queijo Colonial Artesanal (QCA) do Sul do Brasil: Explorando a Diversidade Microbiana e os Aspectos Bioquímicos da Maturação

Metataxonomic Analysis and Chemical Composition of Artisanal Colonial Cheese (ACC) from Southern Brazil: Exploring Microbial Diversity and Biochemical Aspects of Ripening

RESUMO

O queijo colonial artesanal (QCA) é um produto típico do sul do Brasil, feito com leite cru, de forma tradicional e consumido poucas semanas de maturação, apresentando importante relevância socioeconômica e cultural na região. No entanto, não há informações suficientes a respeito de sua composição microbiana e sua relação com ácidos graxos (AG), ácidos orgânicos (AO) e compostos voláteis (CV) presentes, a fim de desenvolver um padrão de identidade e qualidade para o produto. A diversidade microbiana foi avaliada em amostras de QCA, com diferentes tempos de maturação (1, 7, 14, 21 dias) e estações (verão, inverno) através de metataxonômica e análises microbiológicas clássicas. Os QCAs também foram caracterizados quanto ao seu conteúdo de AG e CV por cromatografia gasosa e AO por eletroforese capilar. As análises microbiológicas clássicas indicaram atendimento à legislação em 21 dias de maturação no verão e 14 dias no inverno. As análises físico-químicas classificaram os queijos como “semigordos”, com média-umidade no verão e alta umidade no inverno. A análise metataxonômica revelou 33 famílias de bactérias, com prevalência de *Streptococcaceae* e *Enterobacteriaceae*. Os patógenos encontrados em ambas as épocas, como *Staphylococcus* e *Enterococcus*, apresentaram redução em sua abundância devido à fermentação do queijo promovida por bactérias lácticas (BAL), principalmente do gênero *Lactococcus*. A ecologia fúngica indicou alta abundância de leveduras, principalmente do gênero *Debaryomyces* para todas as amostras, com elevada abundância inicial de *Diutina* no verão, e posterior aumento de *Galactomyces* e *Kodamaea*. No inverno, os gêneros *Debaryomyces* e *Kurtzmaniella* aumentaram em abundância ao longo dos 21 dias de maturação, com redução de *Rhodotorula*. A composição de ácidos graxos dos queijos de verão foi nutricionalmente melhor devido à presença de ácidos graxos insaturados (UFA) em maiores quantidades, principalmente ácido linoleico conjugado (CLA). Os queijos de verão também apresentaram menores concentrações dos ácidos palmítico (C16:0), mirístico (C14:0) e láurico (C12:0), considerados pró-aterogênicos. Para a composição química, os ácidos láctico e butírico/acético foram os AOs majoritários ao longo do tempo de maturação em ambas as estações, com maiores variações no inverno. Ésteres e álcoois foram os CV mais variados, além da presença de aldeídos, terpenos e cetonas. Porém, ao final dos 21 dias de maturação, as maiores concentrações de compostos voláteis foram os álcoois 2-butanol e 3-metilbutanol e os ácidos carboxílicos acético, butanóico e hexanóico. Os dados relatados contribuem para a descrição dos parâmetros de identidade e qualidade relacionados ao QCA e permitem discussões sobre a ecologia microbiana completa e as complexas reações bioquímicas que ocorrem em seu processo de maturação durante as mudanças sazonais.

Palavras-chave: Ácido linoleico conjugado; Alterações bioquímicas; Análises independentes de cultura; Bactérias ácido lácticas; Leite cru; Microbioma do queijo; Sazonalidade

1. INTRODUÇÃO

Alguns queijos artesanais têm seus nomes relacionados ao local em que são produzidos, apresentando conotações históricas e importante função econômica (Bemfeito et al., 2016). O queijo colonial artesanal (QCA) é um produto típico da região Sul do Brasil e seu modo de fabricação foi inicialmente trazido por imigrantes portugueses e transferida para imigrantes italianos e alemães que viviam nesta região. As propriedades desses imigrantes foram chamadas de colônias, daí vem o nome do queijo produzido (Carvalho et al., 2016). O QCA é produzido a partir de leite bovino cru, de cor amarelada, massa compacta, cremosa, macia e com presença de algumas sombras, variando essas características de acordo com o tempo de maturação, que é definida pelo próprio produtor, variando geralmente entre 15 e 30 dias (Kamimura et al., 2019a)

O leite utilizado na fabricação do QCA tem grande influência na qualidade final do produto, principalmente relacionada à ecologia microbiana, além do processo e das condições ambientais em que esse produto foi produzido e, uma maior quantidade de informações a respeito da composição microbiana é necessária para avaliar o impacto destes microrganismos no queijo (Zago et al., 2021; Choi et al., 2020). Análises microbiológicas independentes de cultura enriquecem informações sobre a microbiota presente em queijos de leite cru, incluindo aquelas espécies de microrganismos que anteriormente não estavam associados a esta matriz alimentar, e novos microrganismos não detectados ou identificados anteriormente (O'Sullivan; Cotter, 2017).

Principalmente devido à microbiologia e a fatores de processamento, a massa do queijo apresenta alterações no final da maturação, tornando estes queijos únicos, com características individuais obtidas a partir de reações bioquímicas. As principais reações bioquímicas que ocorrem durante a maturação dos queijos são lipólise, proteólise e catabolismo da lactose, que resultam em alterações nos aromas, sabor e textura do produto, sendo identificadas através de análises físicas e químicas, como determinação do perfil de ácidos graxos (AG), ácidos orgânicos (AO) e compostos voláteis (CV) formados (Fox et al., 2017).

O QCA apresenta uma riqueza de informações científicas relacionadas à composição microbiológica e aos produtos bioquímicos formados a partir da interação desses microrganismos com a composição química dessa matriz alimentar. A partir disso, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a ecologia microbiana, composição fenotípica microbiológica, físico-química e mineral, perfil de ácidos graxos, perfil de ácidos orgânicos e compostos

voláteis de queijo colonial artesanal produzido na região Oeste de Santa Catarina, no município de Seara – SC, a fim de enriquecer a literatura disponível sobre este produto

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Os QCAs foram preparados com leite cru e maturados por vinte e um dias durante duas estações da região Sul do Brasil (região Oeste do Estado de Santa Catarina – Seara/SC). O produtor foi selecionado devido a organização prévia do local, possuindo uma queijaria na propriedade. As oito diferentes amostras de QCA foram coletadas *in loco* e transportadas sob refrigeração (7°C) em caixa térmica com gelo retornável, em sua embalagem original, para análise microbiológica imediata. Posteriormente, as amostras permaneceram congeladas (-18°C) até a realização das demais análises. As amostras foram codificadas de acordo com o tempo de maturação e estação em S01, S07, S14, S21, S01, S07, S14 e S21 (S-W: verão, inverno; 01, 07, 14, 21 – dias de maturação).

2.2 ANÁLISE METAGENÔMICA

O sequenciamento da diversidade microbiana foi realizado através do sequenciamento genético, utilizando MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), realizado em modo *single-end* utilizando o MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), com 300 ciclos. A ecologia foi analisada amplificando os *primers* universais 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) para a região V3/V4 do gene 16s rRNA para bactérias (Wang; Quian, 2009; Caporaso et al., 2012) e com as regiões ITS1 (GAACCGGCGGARGGATCA) e ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) para fungos (Schmidt et al., 2013; White et al., 1990), a partir de uma alíquota de 25 g de queijo homogeneizada com 225 mL de solução salina triptonada. A extração do DNA foi realizada utilizando um protocolo desenvolvido pela Neopropecta (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, BR), com a técnica de *beads* magnética. A amplificação por PCR foi realizada em triplicata utilizando Platinum Taq Polimerase (Invitrogen, Waltham, MA,

EUA), nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 25 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 2 minutos. As análises de sequenciamento foram realizadas utilizando o *pipeline* Sentinel (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, BR) seguindo a pesquisa de Altschul et al. (1990), Andrews (2010), Cock et al. (2009) e Marsella et al. (2012). As sequências de DNA obtidas foram comparadas com o banco de dados Sentinel (Quast et al., 2013) e Greengenes (DeSantis et al., 2006).

2.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A determinação de microrganismos aeróbios mesófilos totais foi realizada de acordo com a norma ISO 4833-1:2015 (ISO, 2015). A determinação de bactérias lácticas (BAL) foi realizada de acordo com a norma ISO 15214:1998 (ISO, 1998). A contagem de *Enterobacteriaceae* foi realizada conforme 21528-2:2020 (ISO, 2020). A contagem de *Escherichia coli* foi realizada conforme ISO/TC 16649-2:2022 (ISO, 2022). A contagem de bolores e leveduras foi realizada de acordo com a norma ISO 6611:2004 IDF 94:2004 (ISO, 2004). A enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada de acordo com a norma ISO 6888-1:2021 (ISO, 2021). A pesquisa da presença de enterotoxina estafilocócica foi realizada utilizando a metodologia AOAC 2007.06:2019 (AOAC, 2019a). A pesquisa da presença de *Salmonella* spp. foi realizada com base na metodologia AOAC 2011.03:2019 (AOAC, 2019b). A pesquisa da presença de *Listeria monocytogenes* foi realizada utilizando a metodologia AOAC 2004.02:2019 (AOAC, 2019c). Os resultados foram expressos em log de unidades formadoras de colônias por grama (log UFC/g).

2.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A determinação da umidade foi realizada pelo método gravimétrico a partir de secagem em estufa a 105 °C, conforme método AOAC 968.11 (AOAC, 2000). A determinação de proteínas foi realizada utilizando o método de Kjeldahl modificado (método 037/IV) (N x 6,38) (IAL, 2008). A determinação do conteúdo lipídico foi realizada de acordo com o método ISO 3433 IDF 222:2008 (ISO, 2008). A análise das cinzas foi realizada conforme método AOAC nº 935.42 (AOAC, 2002). A determinação do perfil mineral nas amostras de QCA foi

realizada utilizando a metodologia descrita por Seraglio et al. (2018). A determinação da atividade de água (a_w) foi realizada utilizando um medidor de a_w (AQUALAB 4TE, METER Group, Pullman, WA, EUA). A análise de acidez foi realizada de acordo com o método AOAC 920.124 (AOAC, 2002b). A determinação do pH foi realizada pelo método eletrométrico utilizando pHmetro (K39-1420a, Kasvi, São José dos Pinhais, SP, BR), seguindo método 017/IV (IAL, 2008). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E ÍNDICE DE QUALIDADE NUTRICIONAL DA GORDURA

O perfil de ácidos graxos (AG) foi realizado por cromatografia gasosa (CG) de acordo com Balthazar et al. (2016), com modificações. Para a extração lipídica foram pesados 8 g de queijo em tubos Falcon de 50 mL e adicionados 8 mL de clorofórmio e 16 mL de metanol na proporção de 1:2. A mistura foi homogeneizada em Ultra-Turrax (IKA T25D, IKA-Werke GmbH & Co, Staufen, BW, DE) por 4 minutos a 13.000 rpm, e em seguida mais 4 mL de clorofórmio e 4 mL de sulfato de sódio anidro (1,5%) foram adicionados. A mistura foi centrifugada (Kasvi K-14-400, São José dos Pinhais, PR, BR) por 10 minutos em 4000 rpm e o sobrenadante e a fase intermediária foram descartados. A fase oleosa foi transferida para um frasco de vidro âmbar e o clorofórmio presente foi evaporado em evaporador rotativo sob vácuo (-300 mmHg) durante 30 minutos a 65°C.

A obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), adaptado de Hartman; Lago (1973), se iniciou misturando 0,1 g de amostra de gordura em 4 mL de solução alcoólica de hidróxido de sódio 0,5 M. A mistura foi aquecida em banho-maria a 99°C por 5 minutos e em seguida resfriada e adicionados 5 mL de solução esterificante, contendo cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico, agitada por 30 s e novamente aquecida em banho-maria por 5 min a 99°C. Após isso, a mistura foi resfriada, adicionados 4 mL de solução saturada de cloreto de sódio, agitada por 30 segundos, adicionados 3 mL de n-hexano, agitada por mais 30 segundos e centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. Por fim, 1 mL da fase superior foi retirado e direcionado para o cromatógrafo de injeção.

Os FAME foram determinados por cromatografia gasosa (GC-2014, Shimadzu, Tóquio, Japão) equipada com detector de ionização de chama (FID) e injetor *split/splitless* utilizando coluna capilar (105 m X 0,25 mm X 0,2 μ m, RTX-2330, Restek, Bellefonte, PA, EUA). As condições de operação foram o uso de nitrogênio com pureza de 99,99% como gás

de arraste a uma vazão de 1,10 mL/min, temperatura da coluna de 140°C por 5 min e depois aumentada a uma taxa de 2,5°C/min até 240°C, mantida por 15 min, injeção e temperatura de detecção de 260°C, aplicando o modo *split*. Os picos FAME foram identificados comparando os tempos de retenção com os padrões FAME (CRM47885, Supelco, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). Para a identificação e quantificação dos isômeros C18:2 c9t11 (Ácido Linoleico Conjugado), foi utilizado o padrão CLA (O5632, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). As quantidades de ácidos graxos foram expressas como g/100 g de ésteres metílicos totais de ácidos graxos.

Os ácidos graxos hipocolesterolemicos (DFA) e hipercolesterolemicos (OFA) foram calculados de acordo com Osmari et al. (2011) e Paszczyk & Łuczyńska (2020), seguindo as equações (1) e (2).

$$\text{DFA} = \text{UFA} + \text{C18:0} \quad (1)$$

$$\text{OFA} = \text{C12:0} + \text{C14:0} + \text{C16:0} \quad (2)$$

sendo UFA a somatória dos ácidos graxos insaturados.

Os índices de aterogenicidade (AI) e trombogenicidade (TI) foram calculados de acordo com as equações (3) e (4) (Batista et al., 2017).

$$\text{AI} = \text{C12:0} + 4 \times \text{C14:0} + \text{C16:0} / [\sum \text{MUFA} + \sum \text{PUFA} (n - 6) \text{ and } (n - 3)] \quad (3)$$

$$\text{TI} = \text{C14:0} + \text{C16:0} + \text{C18:0} / [0.5 \times \sum \text{MUFA} + 0.5 \times \sum \text{PUFA} (n - 6) + 3 \times \sum \text{PUFA} (n - 3) + (n - 3) / (n - 6)] \quad (4)$$

sendo MUFA os ácidos graxos monoinsaturados e PUFA os ácidos graxos poliinsaturados.

A relação hipocolesterolemica e hipercolesterolemica (H/H) foi calculada de acordo com a equação (5) descrita por Paszczyk & Łuczyńska (2020).

$$\text{H/H} = \text{C18:1n-9} + \text{C18:2n-6} + \text{C18:3n-3} / \text{OFA} \quad (5)$$

2.6 ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

A determinação dos ácidos orgânicos alifáticos (AO) foi realizada por meio de eletroforese capilar (EC), conforme metodologia de Brugnerotto et al. (2019). Para a extração dos compostos pesou-se 0,1 g de amostra e sua massa foi completada com água destilada, até massa final de 1 g. A mistura foi imersa em banho ultrassônico (USC 14000A, Unique, Chicalin, Índia) por 2 ciclos de 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 10 min, em centrífuga (MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e congeladas, para aglomeração de gordura. Diluições foram realizadas para cada amostra. Posteriormente, as amostras foram conduzidas em sistema CE-DAD (Modelo 7100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com detector de arranjo de diodos ajustado em 230 nm (detecção indireta, com referência em 360 nm para inversão de pico) e com o dispositivo de controle de temperatura mantido a 20°C. A aquisição e processamento de dados foram realizados utilizando o software HP ChemStation. As separações foram realizadas utilizando um capilar de sílica fundida não revestido (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), com dimensões de 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno. As injeções foram realizadas com pressão hidrodinâmica de 50 mbar por 3 s, e tensão de separação de 15kV, com polaridade positiva ao final da injeção.

2.7 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

A análise dos compostos voláteis (CV) foi realizada por cromatografia gasosa seguindo a metodologia de Wolf et al. (2010). As porções de queijo de 2 g foram acondicionadas em frascos de vidro de 30 mL. As tampas foram lacradas e hermeticamente fechadas. A cromatografia foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso (7890A GC System, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um espectro de massa (5975C Inert MSD with triple Axis Detector, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Os frascos foram termostatizados a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos. A fibra utilizada foi StableFlex DVB/CAR/PDMS 2 cm x 50/30 µm (Supelco, Bellafonte, PA, EUA) e foi exposta no headspace por 15 minutos a $40 \pm 1^\circ\text{C}$. A coluna HP-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent, Santa Clara, Califórnia, EUA) foi utilizada com hélio como gás de arraste. O forno foi programado nas seguintes condições: $45^\circ\text{C}/4$ min, $8^\circ\text{C}/\text{min}$ a 150°C (3 minutos) e $10^\circ\text{C}/\text{min}$ a 250°C (5 minutos). As condições do detector de espectro de massa foram as seguintes: temperatura de

interface de 260°C, tensão de ionização de 70 eV e faixa de massa de 42–300 m/z. Os compostos foram identificados comparando os espectros de massa com a biblioteca do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e comparando os valores do índice de retenção linear (IRL), calculado de acordo com Bizzo et al. (2020). As análises foram realizadas em duplicata.

2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica® 14.0.1 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, EUA). Os dados obtidos em triplicata foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5% de significância). A análise dos dados e a plotagem dos gráficos foram realizadas utilizando o software Origin 10.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com o software XLSTAT versão 2015.2 (Adinsoft, Paris, França). O *autoscaling* dos dados foi realizado antes da análise para dar às variáveis a mesma relevância. Os gráficos representam as cargas fatoriais de cada variável do primeiro fator (CP1) comparado com as cargas fatoriais para o segundo fator (CP2) e terceiro fator (CP3). A rotação Varimax foi utilizada para obter uma melhor separação das amostras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DA ECOLOGIA MICROBIANA

A ecologia microbiana encontrada no QCA é largamente variada. A Figura 1a apresenta a composição de famílias e a Figura 1b a composição de gêneros de bactérias encontradas nas amostras de QCA. Foram identificadas 33 famílias e 62 gêneros de bactérias, divididos em 14 famílias e 28 gêneros no verão e 32 famílias e 56 gêneros no inverno. Devido a produção do QCA ser realizada a partir do leite cru, a contagem total dos microrganismos aeróbios mesófilos se apresentou elevada durante a maturação em ambas as estações do ano, sendo superiores no verão (7,8 – 8,0 log UFC/g). Os resultados foram similares aos encontrados

nos queijos coloniais analisados por Benincá (2021), Daroit; Ribas (2022) e de Koide (2022), os quais foram próximos de 8 log UFC/g. Esta alta contagem está relacionada às boas práticas de ordenha, utensílios e a qualidade do leite utilizado (Ströher et al., 2021). Ainda no verão (Figura 1a, b) houve redução das famílias *Aeromonadaceae*, *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcaceae* durante a maturação. O comportamento se confirma quando observados os dados de gêneros, com redução dos gêneros *Raoultella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Aeromonas*. Os resultados da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva realizados na análise microbiológica também mostraram essa redução das contagens, com valores adequados a legislação vigente no país ($< 3,0$ log UFC/g) (Brasil, 1996). Além disso, como consequência da baixa presença de *Staphylococcus* coagulase positiva ($< 5,0$ log UFC/g), também não foi detectada a presença de enterotoxina estafilocócica. A redução destas bactérias foi esperada devido a sua exclusão por parte da redução do pH, formação de compostos tóxicos e pela má competição por nutrientes, devido a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas por parte das BAL (Coelho; Malcata; Silva, 2022). O gênero *Lactococcus*, BAL majoritária, já se encontrava com uma alta abundância relativa no início da maturação do queijo, e conforme o pH do meio reduziu, devido a sua maturação (Tabela 1), as bactérias da família *Lactobacillaceae* apresentaram aumento, a partir do dia 7 de maturação. As bactérias do gênero *Lactococcus* são consideradas importantes culturas iniciadoras, sendo justificada a sua presença no início da maturação dos queijos (Caro et al., 2020). Sánchez-Gamboa et al. (2018) obtiveram maiores valores de BAL em queijos de leite cru produzidos no período de verão, além do tempo de maturação influenciar significativamente na abundância de *Lactobacillaceae* e *Lactococcus*.

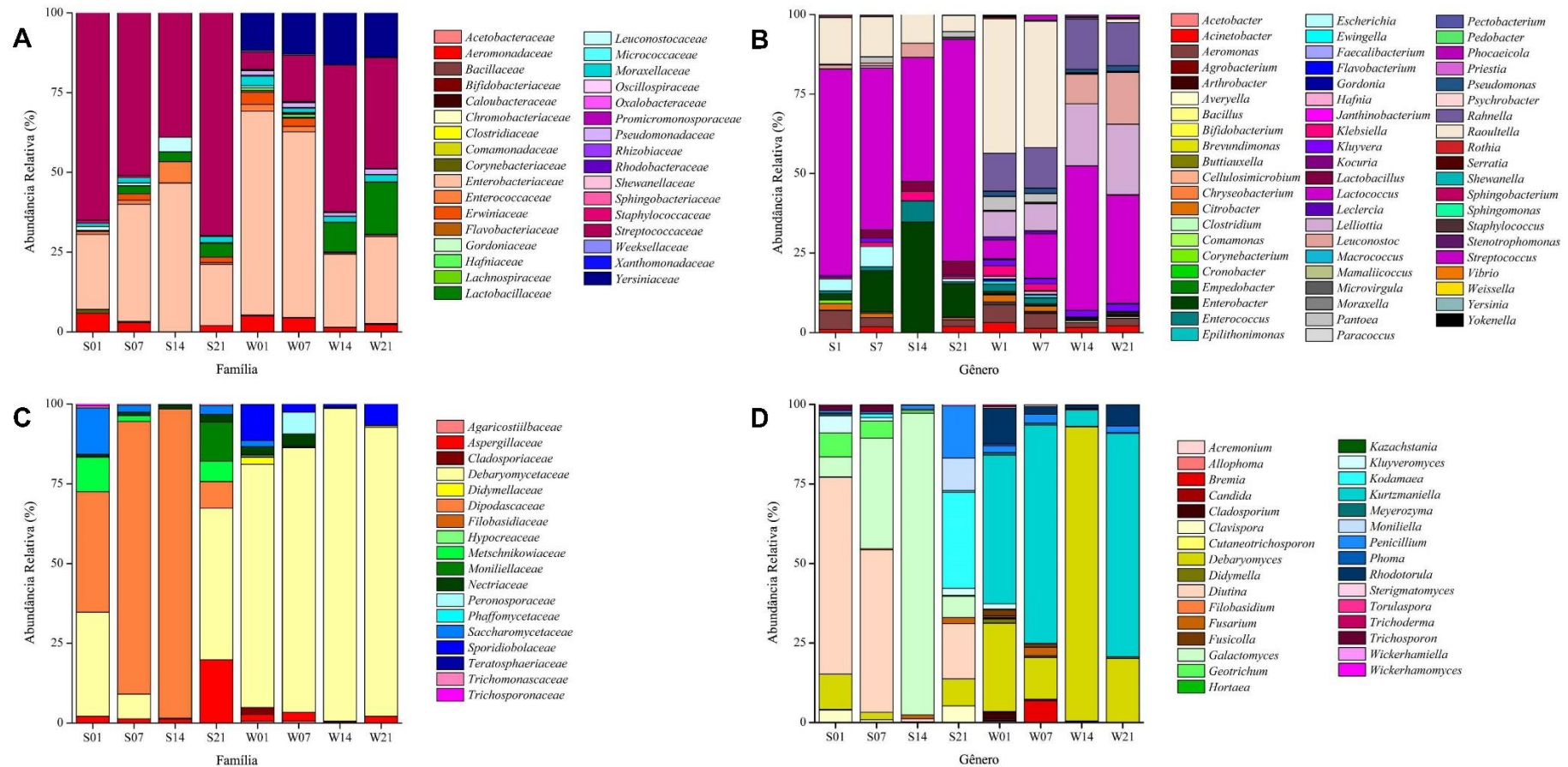
O comportamento da matriz no período de inverno (Figura 1a, b) ocorreu de maneira semelhante. Algumas famílias e espécies citadas no período de verão também apresentaram redução em sua abundância relativa no período de inverno, como *Enterobacteriaceae*, que apresentou elevadas contagens iniciais, superiores a 6,0 log UFC/g, além de *Aeromonadaceae* e *Enterococcaceae*, com posterior redução dos números ao longo da fermentação do QCA. Outras famílias, como *Erwiniaceae*, *Micrococcaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Hafniaceae* e *Yersiniaceae*, representadas principalmente pelos gêneros *Pantoea*, *Rothia*, *Flavobacterium*, *Hafnia* e *Ewingella*, respectivamente, também apresentaram redução de sua abundância relativa. Esta pesquisa encontrou valores superiores a 1% para a família *Pseudomonadaceae* apenas nas amostras de inverno que, juntamente com *Enterobacteriaceae* e *Xanthomonadaceae*, apresenta maiores abundâncias associadas a leites obtidos nesta respectiva estação. Isso se deve a presença destes microrganismos no solo e pastagens, que contaminam as vacas e consequentemente o leite utilizado na produção dos queijos (Celano et al., 2022). No

entanto, para que o queijo apresente liberação para o comércio, o mesmo precisa estar com contagens adequadas de *E. coli*, com valores definidos a partir da umidade do produto. A análise microbiológica, conforme Brasil (2022), mostrou adequação do QCA, com limites para queijos com umidade inferior a 46% (amostras de verão - $\leq 2 \log \text{UFC/g}$) e superior ou igual a 46% (amostras de inverno - $\leq 3 \log \text{UFC/g}$). As bactérias da família *Lactobacillaceae* não apresentaram abundância relevante, com valores totais inferiores a 0,05%. Mas, os gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* apresentaram aumento conforme a maturação se estendia, demonstrando comportamento de aumento tipicamente identificado em BAL. Este comportamento também foi encontrado na análise microbiológica, em destaque no inverno, com o aumento do número de BAL presentes, variando de 5,9 log UFC/g no dia 1 de maturação para 7,6 log UFC/g no dia 21 de maturação. Os resultados da presença e número de BAL presentes no QCA se mostrou superior ao encontrado no trabalho de Carneiro (2021), com amostras produzidas na região Sudoeste do Paraná – BR, que variaram entre 4,08 e 4,13 log UFC/g, e próximos aos encontrados por Koide (2022), produzidos na região Oeste de Santa Catarina – BR, em região próxima as amostras deste estudo, os quais variaram de 7,86 – 8,56 log UFC/g. Assim como nesta pesquisa, Kothe, Mohellibi, Renault (2022) afirmaram que a composição taxonômica dos queijos da região Sul do Brasil possui as BAL como maiores constituintes da microbiota do produto.

Os queijos de ambas as estações apresentaram redução das famílias *Enterobacteriaceae*, *Aeromonadaceae* e *Enterococcaceae*, aumento de gêneros de BAL e elevadas abundâncias relativas de *Streptococcaceae*, que incluem o gênero *Lactococcus*, além da ausência genotípica e fenotípica de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. Similar a este trabalho, Erhardt et al. (2023) identificou a presença de *Lactococcus* em 100% das amostras de QCA analisados no Rio Grande do Sul – SC, com altos valores de abundância relativa (84,20%), juntamente com bactérias das famílias *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae* e *Enterococcus*. Outra pesquisa que corrobora com os resultados apresentados na Figura 1a,b foi de Kothe, Mohellibi, Renault (2022). Os autores realizaram uma análise de abundância diferencial a partir dos resultados taxonômicos obtidos de QCA, o qual identificou domínio de *Lactococcus*, seguido de *Streptococcus* nas amostras da região Sul do Brasil. O gênero *Leuconostoc* apresentou maiores abundâncias após o dia 14 de maturação para ambas as amostras, com valores superiores no inverno. Essa variação entre as estações pode ser explicada devido a maturação do QCA, sendo a família *Leuconostocaceae* mais abundante com valores mais baixos de umidade (Sant’Anna et al., 2019). A sazonalidade e a maturação dos queijos interferiam na ecologia microbiana do produto, limitando a presença de diversos gêneros apenas

em uma estação, a composição química variável da matéria – prima, além da competição entre os microrganismos durante as alterações bioquímicas que ocorreram nos queijos conforme o passar do tempo (Martins et al., 2018). Além disso, *Lactococcus* se mostrou o gênero bacteriano de destaque no QCA, não somente neste trabalho, mas em diversos estudos realizados no queijo colonial artesanal produzido na região Sul do país (Kamimura et al., 2019; Souza et al., 2021), podendo ser considerado um possível marcador microbiano da região.

Figura 1. Abundância relativa (%) de famílias/gêneros de bactérias (A, B) e fungos (C, D) em Queijo Colonial Artesanal (QCA) no verão (S) e inverno (W) durante 1, 7, 14 e 21 dias de maturação.



Em relação a ecologia fúngica (Figura 1c, d), foram identificadas 18 famílias e 31 gêneros de fungos, sendo 9 famílias e 14 gêneros no verão e 14 famílias e 24 gêneros no inverno. O período de verão apresentou maior abundância relativa (76,50%) em relação ao inverno, tendo os resultados de análise microbiológica apresentado valores superiores, em contagem, nesta estação (verão - 4,8 a 6,6 log UFC/g; inverno - 3,1 a 5,4 log UFC/g). O gênero *Penicillium* (Figura 1d) apresentou um aumento durante a maturação com 0,76% de abundância relativa no dia 1 de maturação, tendo sua maior abundância relativa no dia 21 de maturação, alcançando 16,43%. As famílias *Metschnikowiaceae* e *Saccharomycetaceae* apresentaram maior abundância no dia 1 de maturação, iniciando os processos fermentativos do QCA com abundância relativa de 10,78% e 14,51%, respectivamente (Figura 1c), e redução ao longo do restante do período de verão (S21 – 6,31% e 2,69%), tendo isso ocorrido pelas condições da matriz durante a fermentação. Além destas famílias, os gêneros que apresentaram redução ao longo da maturação foram *Debaryomyces*, *Diutina* e *Geotrichum*, o último naturalmente encontrado na microbiota do leite cru e, consequentemente, utilizado na maturação dos queijos, sendo associado a formação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (Grygier et al., 2020). As leveduras que apresentaram maior aumento ao longo da maturação foram das famílias *Debaryomycetaceae* e *Dipodascaceae*, alcançando abundancias de 47,47% (S21) e 96,84% (S14), respectivamente. Em relação aos gêneros que aumentaram ao longo do tempo, os principais foram *Galactomyces* e *Kodamaea*. A presença do gênero *Galactomyces* é associada a presença de BAL, que reduz o pH a partir da formação de ácido lático, tornando o ambiente favorável a multiplicação da levedura, além do ácido ser utilizado como fonte de carbono para o seu crescimento (Szudera-Kończal et al., 2023). *Kodamaea* também foi encontrada na pesquisa de Cardoso et al. (2015) com queijo Serro (Minas Gerais, Brasil), sendo prevalente no período de verão.

No inverno (Figura 1d), após o dia 7 de maturação, o destaque é para a família *Debaryomycetaceae* (W21 – 90,56%) e os gêneros *Kurtzmaniella* (W21 – 70,20%) e *Debaryomyces* (W14 – 92,43%), as quais apresentaram aumento ao longo da maturação. Cardoso et al. (2015) encontraram os gêneros *Kurtzmaniella* e *Debaryomyces* durante todos os períodos estudados no período de inverno em Minas Gerais – BR. Esta estação favorece o crescimento de *Debaryomyces*, tipicamente encontrado nas cascas dos queijos (Wolfe et al., 2014). A principal família e gênero que apresentaram redução no período de inverno foram *Sporidiobolaceae* e *Rhodotorula*. Esta levedura é conhecida por apresentar efeitos antagônicos frente a *L. monocytogenes* (Togay et al., 2020). Também, sendo considerada um contaminante temporário durante a maturação, é esperada a redução de sua presença (Geronikou et al., 2020).

De forma geral, no verão os gêneros *Galactomyces* (S14 – 94,84%) e *Diutina* (S01 – 61,85%) apresentaram-se em maior número, e no inverno foram os gêneros *Kurtzmaniella* (W21 – 70,20%) e *Debaryomyces* (W14 – 92,43%). *Debaryomyces* foi encontrado em 100% das amostras de QCA, alcançando porcentagens elevadas de abundância relativa, principalmente no inverno. Segundo Koide (2022), algumas espécies de leveduras do gênero *Debaryomyces* apresentam a ação de inibir a multiplicação de fungos contaminantes, como gêneros *Cladosporon*, *Fusarium* e *Mucor*. Outro gênero da família *Debaryomycetaceae*, com elevados valores de abundância relativa apenas no verão foi o gênero *Diutina*. A presença destas leveduras em alta abundância relativa nos queijos pode ser relacionada a um possível *terroir* fúngico sazonal da região, juntamente com outras leveduras de destaque, como *Galactomyces* e *Kurtzmaniella*, sendo comumente encontradas em matérias primas associadas às bactérias ácido lácticas, auxiliando na formação dos compostos sensoriais do queijo (Belleggia et al., 2022). O fungo filamentosso *Penicillium*, assim como avaliado no trabalho de Martin et al. (2023) com variação sazonal, não apresentou elevadas abundâncias durante a maturação, não sendo considerado um dos gêneros mais importantes na maturação do QCA. Segundo Martin et al. (2023), as diferenças entre as ecologias microbianas de inverno e verão se dão pela variação da precipitação e umidade de cada estação. Os QCA analisados por Daroit; Ribas (2022), produzidos no noroeste do Rio Grande do Sul – BR, apresentaram valores de bolores e leveduras entre 3 e 5 log UFC/g e Casaril et al. (2017), com amostras de QCA do Sudoeste do Paraná – BR produzidas entre os meses de julho e setembro, entre 2,5 e 5,35 log UFC/g. Estas pesquisas utilizaram amostras de queijos de produtores artesanais, com embalagens não padronizadas, favorecendo a contaminação da superfície dos produtos com esporos de bolores oriundos do ambiente de maturação e comercialização, semelhantes as amostras deste trabalho. Além disso, as leveduras encontradas na matéria-prima (Figura 1c, d) ausente de tratamento térmico também contribuíram para os valores obtidos.

3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os valores de umidade apresentados na Tabela 1 mostram variação significativa ($p < 0,05$) entre as estações para as amostras de queijo. No verão, a umidade de todas as amostras reduziu significativamente ($p < 0,05$), classificando este queijo como um queijo de média umidade (entre 36,0 e 45,9%) no dia 21 de maturação (Brasil, 1996). No entanto, no inverno a redução da umidade durante a maturação foi menor, sendo o queijo classificado como um

produto de alta umidade (entre 46,0 e 54,9%) no final da maturação (Brasil, 1996). A variação do teor de umidade também foi encontrada nos trabalhos de Roldan et al. (2023), que classificou os queijos coloniais analisados em queijos de alta umidade (46,5%), com período de maturação médio de 9,4 dias, e Carvalho et al. (2019), que avaliou QCA produzido no outono e obteve diversos valores de umidade, variando de 33,88% de umidade em 20 dias de maturação a 49,29% em 36 dias de maturação. O tempo de maturação, pressão da prensagem e tipo de salga utilizado estão conjuntamente relacionados ao teor de umidade dos queijos (Louvatel; Degenhardt, 2016) e, quando comparados os valores de umidade iniciais dos produtos, nota-se que a estação do ano apresentou forte influência, devido ao inverno ser tipicamente frio e com alta umidade relativa na região de produção dos queijos. O mesmo comportamento foi observado para a a_w (Tabela 1). Quanto maior a temperatura de maturação, maior será a perda de umidade, concentração de sólidos e consequentemente redução da a_w (Dores et al., 2013). Além disso, o principal componente relacionado a a_w do queijo é o cloreto de sódio, em grande parte proveniente do processo de salga, representando um dos minerais majoritários encontrados nesse tipo de queijo (Tabela 1). Além do sódio, em ambas as estações os minerais majoritários foram o cálcio, potássio e magnésio. O cálcio é o principal mineral relacionado aos derivados lácteos, tendo no queijo sua importância relacionada a formação de ligações de cálcio-caseína para a formação da massa do queijo a partir da hidrólise induzida pelo coalho (Panthi et al., 2017), além de um papel fundamental para formação óssea (Verruck et al., 2019).

Os dados de teor de lipídios e lipídios em matéria seca apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os queijos (Tabela 1). Ambas as estações apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no teor de gordura até o dia 14 de maturação, sendo maior no verão. Segundo Matera et al. (2018), o maior teor de umidade causa diluição dos demais componentes presentes no alimento, sendo esta uma justificativa ao menor teor de lipídios nas amostras de inverno, com relação aos resultados de lipídios em matéria úmida, considerando a alta umidade encontrada (Tabela 1). Quando observadas as concentrações de lipídios em matéria seca, observa-se uma maior concentração nas amostras de inverno. Essa maior concentração de gordura no QCA de inverno se dá, principalmente, a partir da alimentação animal com uma maior concentração de silagem ou ração misturada a pastagem a fim de suplementar as necessidades dos animais (Grille et al., 2023). A partir da classificação definida pela legislação do país, no fim do dia 21 de maturação, ambas as amostras foram classificadas como queijos semigordos (entre 25,0 e 44,9 %) (Brasil, 1996), referindo ao teor de lipídios em matéria úmida. Já em relação ao teor de proteínas presentes nas amostras, os resultados apresentaram similaridade entre os queijos ($p > 0,05$). O teor proteico das amostras não apresentou diferenças

significativas ($p > 0,05$) durante a maturação ou entre as estações, demonstrando uma constância entre os resultados, não sendo afetado também pela variação da alimentação animal durante os períodos avaliados.

Além da variação na composição proximal do QCA, o valor de pH diminuiu na medida em que a acidez aumentava ao longo do período de maturação (Tabela 1). Este comportamento é conhecido, devido a atuação das BAL presentes no QCA, responsáveis pela formação de ácidos orgânicos, ácidos graxos e compostos voláteis que resultam em aumento da acidez e redução do pH dos queijos (De Antônio; Borelli, 2020).

Tabela 1. Análises Físico-Químicas do Queijo Colonial Artesanal (QCA) no verão (S) e inverno (W) durante 1, 7, 14 e 21 dias de maturação.

Análises	Amostras							
	S01	S07	S14	S21	W01	W07	W14	W21
Umidade (g/100 g)	58,73±1,63 ^{aA}	43,51±0,37 ^{bB}	41,71±0,29 ^{bB}	36,89±0,27 ^{cB}	56,40±0,31 ^{aA}	53,87±0,21 ^{bA}	53,30±0,32 ^{bA}	51,39±0,16 ^{cA}
a _w	0,986±0,002 ^{aA}	0,971±0,001 ^{bB}	0,972±0,000 ^{bA}	0,954±0,001 ^{cB}	0,983±0,001 ^{aA}	0,979±0,004 ^{aA}	0,968±0,007 ^{bA}	0,961±0,002 ^{bA}
Proteínas (g/100 g MS)	42,43±6,99 ^{aA}	36,76±1,92 ^{aA}	38,22±1,01 ^{aA}	37,25±0,24 ^{aA}	38,61±2,06 ^{aA}	38,51±3,31 ^{aA}	38,72±0,69 ^{aA}	38,84±1,02 ^{aA}
Lipídios (g/100 g)	25,50±0,00 ^{cA}	27,00±0,00 ^{bA}	32,00±0,00 ^{aA}	32,00±0,00 ^{aA}	26,30±0,35 ^{bA}	23,50±0,00 ^{cB}	27,00±0,00 ^{aB}	27,00±0,00 ^{aB}
Lipídios em MS (g/100 g)	61,89±0,00 ^{aA}	47,80±0,00 ^{dB}	54,89±0,00 ^{bB}	50,71±0,00 ^{cB}	60,22±0,81 ^{aA}	50,93±0,00 ^{dA}	57,82±0,00 ^{bA}	55,54±0,00 ^{cA}
Cinzas (g/100 g MS)	8,36±0,03 ^{aA}	7,26±0,08 ^{bA}	6,82±0,03 ^{dA}	7,00±0,02 ^{cA}	5,92±0,02 ^{bB}	5,14±0,06 ^{cB}	6,76±0,23 ^{aA}	6,72±0,05 ^{aB}
K (g/100 g MS)	0,17±0,02 ^{bB}	0,14±0,01 ^{cB}	0,15±0,01 ^{cB}	0,18±0,01 ^{aB}	0,23±0,01 ^{aA}	0,22±0,01 ^{abA}	0,22±0,01 ^{bA}	0,21±0,01 ^{bA}
Na (g/100 g MS)	0,98±0,07 ^{aA}	0,93±0,03 ^{bA}	0,73±0,03 ^{dB}	0,80±0,02 ^{cA}	0,87±0,02 ^{aB}	1,03±0,39 ^{aA}	1,05±0,41 ^{aA}	1,03±0,37 ^{aA}
Ca (g/100 g MS)	1,80±0,15 ^{abA}	1,64±0,09 ^{cA}	1,87±0,09 ^{aA}	1,68±0,07 ^{bcA}	1,57±0,05 ^{aB}	1,48±0,08 ^{bB}	1,47±0,05 ^{bbB}	1,45±0,08 ^{bbB}
Mg (g/100 g MS)	0,04±0,00 ^{cB}	0,04±0,00 ^{cB}	0,05±0,01 ^{aA}	0,04±0,00 ^{bbB}	0,06±0,00 ^{aA}	0,05±0,00 ^{aA}	0,05±0,00 ^{aA}	0,05±0,00 ^{aA}
Acidez (Ácido Láctico, %)	0,55±0,05 ^{cA}	0,78±0,04 ^{bA}	0,52±0,05 ^{cA}	1,12±0,03 ^{aA}	0,13±0,01 ^{dB}	0,17±0,01 ^{cB}	0,39±0,02 ^{bbB}	0,48±0,00 ^{aB}
pH	5,55±0,20 ^{aB}	5,20±0,02 ^{bbB}	5,16±0,30 ^{cA}	4,90±0,01 ^{dA}	5,89±0,08 ^{aA}	5,74±0,03 ^{bA}	5,05±0,06 ^{cB}	4,94±0,04 ^{cA}

Resultados expressos como média ± desvio padrão. MS – Matéria Seca. Concentração de Mn abaixo do limite de detecção. ^{a-d} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tempos de maturação para uma mesma estação ($p \leq 0,05$). ^{A-B} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as estações no mesmo tempo de maturação ($p \leq 0,05$). S01 – 1 dia de maturação no verão. S07 – 7 dias de maturação no verão. S14 – 14 dias de maturação no verão. S21 – 21 dias de maturação no verão. W01 – 1 dia de maturação no inverno. W07 – 7 dias de maturação no inverno. W14 – 14 dias de maturação no inverno. W21 – 21 dias de maturação no inverno. (-) – Não detectado.

3.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E ÍNDICE DE QUALIDADE NUTRICIONAL DA GORDURA

Na análise do perfil de ácidos graxos dos QCAs analisados foram encontrados 22 ácidos graxos (C4:0 a C20:1), incluindo o isômero c9t11-CLA, sendo os dados apresentados na Tabela 2. Os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) foram encontrados em maiores concentrações nos queijos de inverno ($p < 0,05$), tendo como AGs dominantes os ácidos capróico (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0). Estes SCFA encontrados nos QCAs são produtos do metabolismo de BAL, por exemplo o *Lactiplantibacillus* spp., além de outros gêneros como *Bifidobacterium* spp., e *Clostridium* spp. Os SCFA, com destaque para o ácido butírico, têm sido estudados por suas propriedades anti-inflamatórias e anticarcinogênicas, além de promoverem a redução do pH intestinal, evitando a multiplicação de patógenos (Doublier et al., 2022; Li et al., 2023; Ujlaki et al., 2023). Quando observados os dados de ácidos graxos saturados (SFA), assim como os SCFA, as amostras de inverno também se encontraram em concentrações superiores ($p < 0,05$), com concentrações de ácido palmítico (C16:0) > ácido mirístico (C14:0) > ácido esteárico (C18:0). Diferentemente do período de inverno, no verão as concentrações de ácido esteárico foram superiores em relação ao ácido mirístico. Portanto, a variação sazonal pode estar relacionada a alimentação dos animais usada nas diferentes estações. No trabalho de O’Callaghan et al. (2017) o queijo cheddar produzido a partir do leite de vacas alimentadas com silagem mista apresentou maior quantidade de ácido palmítico, quando comparado com animais alimentados por forragens. As forragens são utilizadas em sua maioria em estações mais quentes devido a capacidade de crescimento da cultura (Fontaneli et al., 2018).

Quando se avaliam os resultados de ácidos graxos insaturados (UFA) (Tabela 2), os valores de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) foram superiores ($p < 0,05$) no verão, assim como os valores de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA). A concentração de ácido oleico se destacou em relação aos demais AGs, com valores mais elevados que SFAs. Outro ponto de destaque foi a concentração de CLA + ácido eicosenóico (C20:1), que foi mais de duas vezes maior que no período de inverno. As quantidades de C20:1 em queijos artesanais brasileiros são pouco representativas, variando entre não detectado (Bezerra, 2022, Laurindo et al., 2017; de Souza et al., 2015) a 0,167 g/100 g (Brandielli, 2016, Melo et al., 2018, Olivo, 2019), sendo assim, a quantidade apresentada na Tabela 2 foi considerada majoritária para CLA. O CLA é conhecido por possuir efeitos contra doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e obesidade, podendo ser utilizado como um composto bioativo na prevenção de desordens metabólicas

(Khan et al., 2022). Sendo mais presente na conformação C18:2c9t11, o CLA é metabolizado no rúmen a partir da conversão do ácido linoleico por meio de biohidrogenação (Siurana & Calsamiglia, 2016) e, apenas os produtos derivados de ruminantes apresentam quantidades relevantes de CLA a serem ingeridos (Ritzenthaler et al., 2001). O trabalho de Siurana & Calsamiglia (2016) sugere uma ingestão diária de CLA variando de 0,8 a 3,2 g por dia. Ajustando os valores de gordura e considerando uma porção média de 30 g de QCA (Brasil, 2020) com 21 dias de maturação, o queijo produzido no verão fornece 0,19 g de CLA.

As amostras de verão também demonstraram a presença do isômero *trans* do ácido graxo C18:2 (n-6t) conhecido como ácido linolelaídico. O'Callaghan et al. (2017) encontrou concentrações significativamente superiores de ácido linolelaídico, CLA e linolênico nos queijos cheddar produzidos com leite de animais alimentados com pastagens. Alimentação com pastagens de verão apresentam melhores valores de UFAs em relação as pastagens de inverno (Grille et al., 2023) e, na região de produção do QCA os animais recebem alimentação baseada neste tipo de pastagem, sendo então a qualidade nutricional da gordura do queijo afetada pela variação sazonal.

Avaliando a qualidade nutricional dos QCAs, foi observado que os queijos de inverno se mostraram mais hipercolesterolêmicos, devido as maiores concentrações de C14:0 e C16:0, que, segundo a literatura, favorecem a adesão de lipídios às células do sistema circulatório (Chen; Liu, 2020). Os índices de aterogenicidade e trombogenicidade, relacionados a agregação de placas de gordura e aumento dos níveis de colesterol (Ioannidou et al., 2022), estão relacionados aos índices colesterolêmicos, se mostrando menores ($p < 0,05$) nas amostras de verão, que apresentam maiores concentrações de UFA e ácido esteárico. A alimentação dos animais com maior utilização de pastagens resultou em leites com menores valores de AI e TI, quando comparados a animais alimentados com ração animal (O'Callagham et al., 2016). A relação H/H, correlacionada com os índices de aterogenicidade e trombogenicidade, se refere a atividade funcional dos ácidos graxos no metabolismo das lipoproteínas para o transporte do colesterol e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Paszczyk, 2022; Wang et al., 2017). Ainda, segundo Paszczyk (2022), valores mais elevados de H/H são nutricionalmente melhores. Os QCAs de verão apresentaram valores de H/H mais elevados ($p < 0,05$), devido a maior presença de UFA, e menores valores de ácidos graxos hipercolesterolêmicos.

Tabela 2. Perfil de Ácidos Graxos do QCA.

Ácidos Graxos (g/100 g)	Amostras							
	S01	S07	S14	S21	W01	W07	W14	W21
C4:0	0,938±0,090 ^{aA}	0,797±0,009 ^{aA}	0,773±0,022 ^{aA}	0,825±0,009 ^{aA}	0,804±0,017 ^{aA}	0,773±0,040 ^{aA}	0,786±0,021 ^{aA}	0,786±0,011 ^{aA}
C6:0	1,342±0,108 ^{aA}	1,138±0,005 ^{abB}	0,991±0,045 ^{bB}	1,111±0,013 ^{abB}	1,291±0,013 ^{aA}	1,315±0,012 ^{aA}	1,281±0,005 ^{aA}	1,285±0,009 ^{aA}
C8:0	0,997±0,067 ^{aA}	0,791±0,006 ^{bB}	0,651±0,032 ^{bB}	0,776±0,013 ^{bB}	1,068±0,003 ^{aA}	1,071±0,013 ^{aA}	1,065±0,001 ^{aA}	1,058±0,008 ^{aA}
C10:0	2,183±0,132 ^{aB}	1,754±0,020 ^{bB}	1,402±0,053 ^{cB}	1,673±0,033 ^{bcB}	3,026±0,000 ^{aA}	2,991±0,025 ^{aA}	2,999±0,004 ^{aA}	2,979±0,017 ^{aA}
C11:0	-	0,202±0,004 ^a	0,167±0,008 ^b	0,193±0,001 ^a	-	-	-	-
C12:0	2,591±0,139 ^{aB}	2,176±0,047 ^{bB}	1,769±0,043 ^{cB}	2,062±0,025 ^{bcB}	4,277±0,193 ^{aA}	4,096±0,018 ^{aA}	4,148±0,019 ^{aA}	4,118±0,018 ^{aA}
C14:0	10,052±0,347 ^{aB}	9,689±0,188 ^{abB}	8,389±0,061 ^{cB}	9,055±0,108 ^{bcB}	14,280±0,006 ^{aA}	14,184±0,025 ^{bA}	14,269±0,032 ^{abA}	14,244±0,013 ^{abA}
C14:1	0,961±0,068 ^{aB}	1,721±0,017 ^{bA}	0,838±0,053 ^{bB}	0,900±0,016 ^{bB}	2,054±0,008 ^{aA}	1,606±0,064 ^{aA}	1,917±0,338 ^{aA}	1,618±0,081 ^{aA}
C15:0	1,301±0,032 ^{bA}	1,561±0,037 ^{aA}	1,550±0,009 ^{aA}	1,515±0,021 ^{aA}	1,219±0,004 ^{aA}	1,215±0,006 ^{abB}	1,206±0,002 ^{abB}	1,195±0,008 ^{bB}
C15:1	0,344±0,006 ^{aB}	0,399±0,021 ^{aA}	0,371±0,025 ^{aA}	0,393±0,018 ^{aA}	0,379±0,003 ^{aA}	0,376±0,007 ^{aA}	0,371±0,003 ^{aA}	0,369±0,005 ^{aA}
C16:0	26,998±0,223 ^{aB}	26,307±0,114 ^{aB}	25,197±0,243 ^{bB}	26,329±0,170 ^{aB}	39,220±0,175 ^{aA}	39,306±0,054 ^{aA}	39,249±0,021 ^{aA}	39,090±0,116 ^{aA}
C16:1	0,995±0,122 ^{aB}	0,861±0,058 ^{aB}	0,774±0,008 ^{aB}	0,758±0,021 ^{aB}	1,704±0,021 ^{bA}	1,674±0,012 ^{bA}	1,837±0,011 ^{aA}	1,805±0,023 ^{aA}
C17:0	0,949±0,016 ^{aA}	0,927±0,013 ^{aA}	0,934±0,010 ^{aA}	0,917±0,004 ^{aA}	0,642±0,015 ^{aB}	0,648±0,012 ^{aB}	0,642±0,010 ^{aB}	0,640±0,015 ^{aB}
C17:1	0,336±0,004 ^{aA}	0,327±0,004 ^{aA}	0,314±0,008 ^{aA}	0,313±0,006 ^{aA}	0,239±0,003 ^{aB}	0,239±0,003 ^{aB}	0,250±0,013 ^{aB}	0,240±0,001 ^{aB}
C18:0	14,723±0,059 ^{bA}	13,796±0,037 ^{cA}	15,323±0,030 ^{aA}	14,881±0,059 ^{bA}	6,945±0,001 ^{aB}	6,862±0,006 ^{aB}	6,729±0,004 ^{bB}	6,654±0,042 ^{bB}
C18:1n-9	28,498±1,014 ^{bA}	30,440±0,543 ^{bA}	32,900±0,066 ^{aA}	30,751±0,261 ^{abA}	18,035±0,020 ^{aB}	18,381±0,177 ^{aB}	18,219±0,151 ^{aB}	18,077±0,024 ^{aB}
C18:2n-6t	0,146±0,011 ^a	0,115±0,008 ^a	0,124±0,007 ^a	0,130±0,014 ^a	-	-	-	-
C18:2n-6	0,941±0,040 ^{aA}	0,608±0,238 ^{aA}	0,973±0,240 ^{aA}	0,810±0,018 ^{aA}	0,704±0,004 ^{aB}	0,657±0,100 ^{aA}	0,584±0,017 ^{aA}	0,576±0,005 ^{aB}
C18:3n-3	0,545±0,004 ^{aA}	0,519±0,010 ^{aA}	0,479±0,015 ^{bA}	0,548±0,007 ^{aA}	0,282±0,005 ^{aB}	0,295±0,002 ^{aB}	0,283±0,004 ^{aB}	0,281±0,003 ^{aB}
C20:0	0,183±0,003 ^{cA}	0,202±0,001 ^{bA}	0,231±0,003 ^{aA}	0,226±0,007 ^{aA}	0,125±0,001 ^{aB}	0,129±0,007 ^{aB}	0,128±0,000 ^{aB}	0,137±0,006 ^{aB}
C18:2c9t11 (CLA) + C20:1	1,398±0,012 ^{bA}	2,045±0,021 ^{aA}	2,032±0,086 ^{aA}	1,986±0,018 ^{aA}	0,622±0,006 ^{aB}	0,685±0,024 ^{aB}	0,590±0,007 ^{aB}	0,620±0,045 ^{aB}

Não-Identificados	3,585±0,049 ^{aA}	3,459±0,078 ^{aA}	3,823±0,334 ^{aA}	3,853±0,028 ^{aB}	3,223±0,082 ^{bB}	3,504±0,142 ^{abA}	3,451±0,326 ^{bA}	4,231±0,074 ^{aA}
ΣSCFA	5,459±0,397 ^{aA}	4,479±0,022 ^{bB}	3,815±0,107 ^{bB}	4,383±0,042 ^{bB}	6,189±0,033 ^{aA}	6,149±0,014 ^{aA}	6,129±0,020 ^{aA}	6,108±0,046 ^{aA}
ΣSFA	62,253±1,061 ^{aB}	59,337±0,461 ^{bB}	57,374±0,069 ^{bB}	59,559±0,253 ^{bB}	72,895±0,320 ^{aA}	72,587±0,006 ^{abA}	72,498±0,099 ^{abA}	72,184±0,010 ^{bA}
ΣUFA	34,161±1,109 ^{bA}	37,035±0,298 ^{aA}	38,802±0,402 ^{aA}	36,588±0,279 ^{abA}	24,017±0,046 ^{aB}	23,911±0,137 ^{aB}	24,051±0,227 ^{aB}	23,585±0,084 ^{aB}
ΣMUFA	31,133±1,066 ^{bA}	33,748±0,559 ^{aA}	35,195±0,054 ^{aA}	33,114±0,236 ^{abA}	22,410±0,048 ^{aB}	22,275±0,263 ^{aB}	22,594±0,214 ^{aB}	22,108±0,132 ^{aB}
ΣPUFA	1,631±0,055 ^{aA}	1,242±0,239 ^{aA}	1,576±0,262 ^{aA}	1,488±0,025 ^{aA}	0,985±0,008 ^{aB}	0,951±0,102 ^{aA}	0,867±0,021 ^{aA}	0,857±0,002 ^{aB}
CLA + C20:1	1,398±0,012 ^{bA}	2,045±0,021 ^{bA}	2,032±0,086 ^{bA}	1,986±0,018 ^{bA}	0,622±0,006 ^{aB}	0,685±0,024 ^{aB}	0,590±0,007 ^{aB}	0,620±0,045 ^{aB}
DFA	48,884±1,167 ^{bA}	50,831±0,262 ^{bA}	54,125±0,372 ^{aA}	51,469±0,339 ^{bA}	30,961±0,047 ^{aB}	30,773±0,131 ^{abB}	30,780±0,223 ^{abB}	30,239±0,127 ^{bB}
OFA	39,640±0,710 ^{aB}	38,172±0,349 ^{abB}	35,354±0,139 ^{cB}	37,445±0,303 ^{bB}	57,777±0,363 ^{aA}	57,586±0,011 ^{aA}	57,665±0,071 ^{aA}	57,452±0,085 ^{aA}
AI	2,132±0,126 ^{aB}	1,922±0,044 ^{abB}	1,646±0,013 ^{bB}	1,867±0,032 ^{abB}	4,301±0,022 ^{aA}	4,312±0,033 ^{aA}	4,283±0,036 ^{aA}	4,363±0,027 ^{aA}
TI	2,839±0,114 ^{aB}	2,548±0,064 ^{bB}	2,442±0,024 ^{bB}	2,611±0,023 ^{abB}	4,722±0,014 ^{aA}	4,714±0,050 ^{aA}	4,663±0,039 ^{aA}	4,734±0,035 ^{aA}
H/H	0,760±0,041 ^{cA}	0,830±0,016 ^{bcA}	0,975±0,013 ^{aA}	0,861±0,015 ^{bA}	0,329±0,002 ^{aB}	0,336±0,001 ^{aB}	0,331±0,003 ^{aB}	0,330±0,001 ^{aB}

Resultados expressos como média ± desvio padrão. g/100 g de gordura. ^{a-d} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tempos de maturação para uma mesma estação ($p \leq 0,05$). ^{A-B} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as estações no mesmo tempo de maturação ($p \leq 0,05$). S01 – 1 dia de maturação no verão. S07 – 7 dias de maturação no verão. S14 – 14 dias de maturação no verão. S21 – 21 dias de maturação no verão. W01 – 1 dia de maturação no inverno. W07 – 7 dias de maturação no inverno. W14 – 14 dias de maturação no inverno. W21 – 21 dias de maturação no inverno. (-) – Não detectado. ΣSCFA – Soma dos ácidos graxos de cadeia curta (C4:0, C6:0, C8:0, C10:0). ΣSFA – Soma dos ácidos graxos saturados. ΣUFA – Soma dos ácidos graxos insaturados. ΣMUFA – Soma dos ácidos graxos monoinsaturados (não foi considerado o C20:1). ΣPUFA – Soma dos ácidos graxos poli-insaturados (não foi considerado o C18:2c9t11). CLA – Ácido linoleico conjugado. DFA – Ácidos graxos hipocolesterolêmicos. OFA – Ácidos graxos hipercolesterolêmicos. AI – Índice de aterogenicidade (não foram considerados CLA+C20:1). TI – Índice de trombogenicidade (não foram considerados CLA+C20:1). H/H – Relação de ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (não foram considerados CLA+C20:1).

3.4 ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os resultados obtidos na análise de ácidos orgânicos do QCA estão apresentados na Tabela 3. Nas amostras, o ácido láctico foi o AO de maior concentração, seguido por ácido acético/ácido butírico. Devido à proximidade dos picos destes dois ácidos e o tamanho da cadeia carbônica (C2 e C4), não foi possível separá-los utilizando a EC. Os principais formadores de ácidos orgânicos em queijos, são as BAL. O ácido majoritário formado por elas é o láctico, sendo que algumas espécies heterofermentativas também formam outros ácidos como o acético ou butírico em grandes proporções. Uma das formas de produção de ácido acético é a partir da lactose, pelas BAL, por meio da degradação de aminoácidos ou fermentação láctica (Matera et al., 2018), apresentando uma tendência de aumento, conforme o consumo de lactose disponível no QCA. Outra forma de produção de ácido acético é a partir da metabolização do citrato, também utilizado como substrato por parte das BAL, como *Lactococcus* e *Leuconostoc* que estavam presentes nas amostras de QCAs (Figura 1b) (Matera et al., 2018). Além disso, o ácido butírico é formado a partir da quebra dos triacilgliceróis com uso de lipases, além de ser formado a partir da desaminação das caseínas durante proteólise, tendo as BAL como principais contribuintes neste processo, mas também bactérias do gênero *Clostridium* (Figura 1b) podem transformar açúcares em ácido butírico (Murtaza et al., 2022). Enquanto isso, o ácido succínico encontrado nas amostras de QCA é produto das NSLAB, principalmente da família *Lactobacillaceae*, a partir do ácido cítrico na rota metabólica do ácido tricarboxílico (TCA) (Dudley; Steele, 2005) justificando a variação ($p < 0,05$) de ácido cítrico no inverno (Tabela 3).

As amostras de inverno apresentaram maior variação de ácidos orgânicos, diferindo das amostras de verão, as quais apresentaram maior variação de compostos voláteis (Tabela 4), muito provavelmente devido a fatores como variação da alimentação animal e condições climáticas no local de produção dos queijos (Pino et al., 2021). Por exemplo, foi detectada a presença de ácido cítrico e propiônico nessas amostras. O citrato também participa do ciclo de krebs, para a formação do ácido cítrico encontrado nas amostras de inverno (Matera et al., 2018). Além disso, diversas bactérias produzem o ácido propiônico, sendo majoritariamente as bactérias do gênero *Propionibacterium*, mas também algumas espécies patogênicas, como *Clostridium*. A sua produção se dá a partir da fermentação do lactato com a utilização de aspartato como aceptor de elétrons, tendo como produtos da fermentação os ácidos propiônico, acético, succínico e dióxido de carbono (Castro, 2014; Fröhlich-Wyder et al., 2017). Alguns ácidos orgânicos também são importantes precursores de compostos voláteis que apresentam grande influência nas características sensoriais dos queijos (Bertuzzi et al., 2018).

Tabela 3. Ácidos Orgânicos do QCA.

Amostras	Ácidos Orgânicos				
	Cítrico (g/100 g)	Lático (g/100 g)	Succínico (g/100 g)	Acético/Butírico (g/100 g)	Propiônico (g/100 g)
S01	<LQ	0,145±0,015 ^{cA}	<LQ	0,027±0,006 ^{aA}	<LQ
S07	<LQ	0,218±0,019 ^{bB}	<LQ	0,028±0,000 ^{aB}	<LQ
S14	<LQ	0,184±0,004 ^{bcB}	<LQ	0,030±0,007 ^{aB}	<LQ
S21	<LQ	0,364±0,019 ^{aB}	0,023±0,001 ^A	0,031±0,007 ^{aB}	<LQ
W01	0,088±0,004 ^a	0,024±0,003 ^{dB}	0,010±0,000 ^a	0,022±0,001 ^{dA}	0,021±0,001 ^a
W07	0,090±0,002 ^a	0,467±0,015 ^{cA}	0,004±0,000 ^c	0,041±0,001 ^{cA}	0,022±0,001 ^a
W14	0,071±0,002 ^b	0,856±0,016 ^{bA}	0,007±0,000 ^b	0,088±0,002 ^{bA}	<LQ
W21	0,069±0,004 ^b	1,046±0,127 ^{aA}	0,007±0,000 ^{bB}	0,106±0,006 ^{aA}	<LQ

Resultados expressos como média ± desvio padrão. ^{a-d} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tempos de maturação para uma mesma estação ($p \leq 0,05$). ^{A-B} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as estações no mesmo tempo de maturação ($p \leq 0,05$). S01 – 1 dia de maturação no verão. S07 – 7 dias de maturação no verão. S14 – 14 dias de maturação no verão. S21 – 21 dias de maturação no verão. W01 – 1 dia de maturação no inverno. W07 – 7 dias de maturação no inverno. W14 – 14 dias de maturação no inverno. W21 – 21 dias de maturação no inverno. LQ – Limite de quantificação.

3.5 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

A análise de compostos voláteis, apresentada na Tabela 4, demonstrou a presença de 38 compostos diferentes, classificados a partir do seu grupo funcional em álcoois (8), aldeídos (3), ácidos carboxílicos (5), ésteres (14), cetonas (7) e terpenos (1). Dos oito compostos encontrados do grupo dos álcoois, foram encontrados três álcoois secundários de cadeia linear, um álcool primário de cadeia ramificada, três álcoois secundários de cadeia ramificada e um álcool aromático (Tabela 4). O 3-metilbutanol foi o principal álcool presente, com maior porcentagem de área. No entanto, o seu comportamento foi estável até o dia 14 de maturação, com aumento no dia 21 de maturação no inverno, representando mais de 60% do total de compostos voláteis presentes na amostra W21. Este álcool ramificado pode ser derivado da redução do 3-metilbutanal, aldeído principal das amostras de inverno, o qual é formado a partir do aminoácido leucina, na reação de Strecker, promovendo a liberação de aromas de malte e manteiga no queijo (Teter et al., 2020; Wolf et al., 2010). O 2,3-butanediol, segundo álcool majoritário nas amostras de verão, é um produto do metabolismo da lactose e citrato por meio das BAL (Kilcawley, 2017).

Nas amostras de verão, o 2-metilpropanal foi o aldeído majoritário, sendo um dos principais compostos de odores ativos do queijo, produzido a partir da transaminação do

aminoácido valina (Ianni et al., 2020; Manzo et al., 2019; Marilley, 2004; Wolf et al., 2010). Enquanto isso, em relação aos resultados de ácidos carboxílicos obtidos no período de verão (Tabela 4), os maiores valores de área foram obtidos no dia 21 de maturação, com ácidos carboxílicos de cadeia linear e curta (C4 - C10). Nas amostras de inverno, os ácidos carboxílicos apresentaram uma redução após o dia 7 de maturação. Estes resultados se correlacionam com a presença dos ácidos graxos C4:0 (butanóico/butírico) e C6:0 (hexanóico/capróico) (Tabela 2). Estes dois ácidos graxos são responsáveis pelos odores fortes do queijo, apresentando tendência de aumento ao longo da maturação (Ianni et al., 2020). O aumento destes ácidos graxos se deve a autólise que ocorre nas SLAB, como *Lactococcus* (Figura 1b), que promove a liberação de enzimas lipolíticas, as quais quebram os triacilgliceróis, liberando estes ácidos graxos de cadeia curta (Collins et al., 2003). Além das SLAB, algumas espécies de fungos também são responsáveis pela formação de ácidos carboxílicos, como o gênero *Geotrichum* encontrados nas amostras de QCAs (Figura 1d) (Bertuzzi et al., 2018). Os valores detectados para ácido acético não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) (Tabela 4) entre as estações no dia 21 de maturação, diferente do que aconteceu na análise de ácidos orgânicos, que apresentou diferença ($p < 0,05$) (Tabela 3). Na análise de ácidos orgânicos, os ácidos acéticos e butírico não foram passíveis de separação, o que pode justificar a diferença de resultados entre as análises.

No QCA de verão foi encontrada uma variedade de ésteres, com predomínio de acetatos no início da maturação e ésteres de ácidos graxos a partir do dia 14 de maturação. Os ésteres etílicos apresentaram um aumento ao longo da fermentação do QCA. Delgado et al. (2010) afirma que a produção destes ésteres é realizada pelas BAL, que aumentam o seu número de células ao longo do tempo. No inverno, os ésteres apresentaram a tendência de redução da sua concentração, sendo identificados apenas três compostos. O acetato de etila e o éster etílico do ácido butanóico encontrados são formados pelos OA acético e butírico (butanóico) (Tabela 3) (Natrella et al., 2020). O éster etílico do ácido butírico apresentou mesmo comportamento que o seu ácido carboxílico, de redução ao longo da maturação (Tabela 3).

De forma geral, as cetonas apresentaram um comportamento de redução da sua concentração ao longo do período de maturação. Estes componentes apresentam baixos limiares de percepção, promovendo grande contribuição na formação de aroma do QCA (Karali et al., 2013). Segundo a literatura a acetoina, componente que promove o sabor cremoso e amanteigado do queijo, está presente apenas no período inicial da maturação, sendo posteriormente oxidada em 2,3-butanodiona (diacetil) (Matera et al., 2018; Teter et al., 2020), justificando sua maior área no início da maturação, e a quase inexistência no dia 21 de maturação, nos queijos de inverno e também a presença de 2,3-butanodiona após o dia 14 de

maturação do verão. Enquanto isso, a 2-heptanona foi a cetona predominante no início da fermentação do QCA no verão. Este composto está presente no queijo devido a alimentação animal com pastagens (Kilcawley et al., 2018), assim como o α -pineno, terpeno encontrado nos queijos de verão que promove notas de pinho, é proveniente da alimentação do animal com forragens e pastagens naturais (Kalač, 2011; Serrapica et al., 2020).

Tabela 4. Compostos Voláteis do QCA.

Compostos Voláteis	Área (%)							
	S01	S07	S14	S21	W01	W07	W14	W21
<i>Alcoois</i>								
2-Butanol	-	-	-	15,073±0,728	-	-	-	-
3-Metilbutanol	11,119±0,029 ^{aA}	8,068±0,536 ^{abA}	4,987±1,992 ^{bbB}	-	12,553±0,721 ^{bA}	13,678±3,785 ^{baA}	18,508±0,212 ^{baA}	65,706±13,320 ^a
3-Metil-3-buten-2- ol	-	-	-	-	-	0,157±0,000	-	-
3-Metil-2-butanol	-	-	-	-	-	0,597±0,000 ^b	-	0,660±0,000 ^a
2,3-Butanediol	1,209±0,000 ^a	0,942±0,439 ^a	0,678±0,383 ^a	-	-	-	-	-
2-Heptanol	-	-	-	-	0,506±0,000	-	-	-
2,6-Dimetil-4- heptanol	-	-	-	-	0,241±0,104	-	-	-
Álcool Feniletílico	0,786±0,154 ^a	0,344±0,154 ^{ab}	0,154±0,000 ^b	-	-	-	-	2,145±0,799
<i>Aldeídos</i>								
2-Metilpropanal	-	-	16,888±0,000	-	-	-	-	-
3-Metilbutanal	-	-	-	-	0,757±0,652 ^a	-	1,099±0,000 ^a	1,073±0,074 ^a
Benzeno	-	-	-	0,144±0,000	-	-	-	-
Acetaldeído	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ácidos Carboxílicos</i>								
Ácido Acético	-	-	-	7,013±2,558 ^A	-	9,291±1,405 ^b	19,082±3,508 ^a	7,975±0,000 ^{baA}
Ácido Butanóico	-	0,525±0,429 ^{baA}	0,740±0,543 ^b	10,452±0,139 ^a	8,685±2,165 ^a	6,492±7,464 ^{aA}	-	-
Ácido 3- Metilbutanóico	-	1,336±0,151 ^a	0,560±0,045 ^b	0,840±0,045 ^{baA}	-	-	-	0,175±0,041 ^B
Ácido Hexanóico	-	0,108±0,000 ^{caA}	0,970±0,000 ^b	6,907±0,240 ^a	18,163±1,767 ^a	6,625±8,681 ^{aA}	-	-
Ácido Octanóico	-	-	-	-	0,636±0,300	-	-	-
<i>Ésteres</i>								
Acetato de Etila	5,202±0,023 ^{aB}	14,078±10,882 ^{aA}	6,702±0,000 ^a	-	11,317±0,945 ^{aA}	5,455±0,813 ^{baA}	-	-
Acetato de Isopropila	-	-	-	4,413±0,000	-	-	-	-
Acetato de Sec- Butila	-	2,174±0,051 ^b	10,104±0,000 ^a	1,530±0,156 ^c	-	-	-	-
Acetato de Isobutila	-	1,798±0,036	-	-	-	-	-	-
Ácido Butanóico, Éster Etilico	1,110±0,000 ^{bbB}	-	0,498±0,000 ^{cbB}	2,695±0,120 ^{aA}	8,298±0,627 ^{aA}	5,604±0,302 ^b	1,847±0,078 ^{caA}	1,700±0,375 ^{caA}
Acetato de Isoamila	1,782±0,380 ^b	2,955±0,055 ^a	1,843±0,000 ^b	-	-	-	-	0,232±0,044
Acetato de 2- Metilbutila	-	-	0,969±0,000	-	-	-	-	-

Ácido Butanóico, Éster Propílico	-	-	-	0,313±0,002	-	-	-	-
Ácido Butanóico, Éster 1-Metilpropílico	-	-	0,141±0,007 ^a	0,135±0,020 ^a	-	-	-	-
Ácido Hexanóico, Éster Etilico	0,584±0,006 ^c	1,025±0,030 ^{bc}	1,411±0,060 ^b	3,128±0,226 ^a	-	-	-	-
Ácido Hexanóico, Éster Propílico	-	-	0,056±0,000	-	-	-	-	-
Ácido Octanóico, Éster Etilico	-	0,159±0,018 ^b	0,228±0,072 ^b	0,513±0,044 ^a	-	-	-	-
Ácido Acético, Éster 2-Feniletílico	-	0,157±0,042 ^a	0,360±0,299 ^a	-	-	-	-	-
Ácido Decanóico, Éster Etilico	-	-	-	0,192±0,020	-	-	-	-
<i>Cetonas</i>								
2,3-Butanodiona	-	-	4,332±0,000 ^a	3,982±0,000 ^b	-	-	-	-
2-Butanona	-	-	2,417±0,120	-	-	-	-	-
Acetoína	-	-	-	-	15,045±0,232 ^a	10,850±0,942 ^b	2,630±1,066 ^c	0,297±0,000 ^c
2-Heptanona	3,779±0,623 ^{aA}	4,404±1,756 ^{aA}	1,217±0,002 ^a	2,286±0,083 ^a	1,563±0,048 ^{aB}	0,363±0,189 ^{bA}	-	-
5-Metil-2-hexanona	-	0,806±0,000	-	-	-	-	-	-
8-Nonen-2-ona	0,054±0,000 ^a	0,127±0,027 ^a	-	-	-	-	-	-
2-Nonanona	1,182±0,001 ^{aA}	0,869±0,025 ^{bA}	0,324±0,089 ^c	0,288±0,009 ^c	0,446±0,140 ^{aB}	0,056±0,000 ^{aB}	-	-
<i>Terpenos</i>								
α-Pineno	-	0,040±0,022 ^a	0,085±0,000 ^a	-	-	-	-	-
Compostos Não-identificados	74,380±2,512 ^{aA}	60,541±8,395 ^{aA}	64,504±14,143 ^{aA}	44,364±1,931 ^{aA}	22,043±5,009 ^{aB}	41,236±22,705 ^{aA}	57,384±1,955 ^{aA}	24,503±7,499 ^{aA}

Resultados expressos como média ± desvio padrão. ^{a-d} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tempos de maturação para uma mesma estação ($p \leq 0,05$). ^{A-B} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as estações no mesmo tempo de maturação ($p \leq 0,05$). S01 – 1 dia de maturação no verão. S07 – 7 dias de maturação no verão. S14 – 14 dias de maturação no verão. S21 – 21 dias de maturação no verão. W01 – 1 dia de maturação no inverno. W07 – 7 dias de maturação no inverno. W14 – 14 dias de maturação no inverno. W21 – 21 dias de maturação no inverno. (-) – Não detectado.

3.6 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A fim de comparar as composições taxonômicas de bactérias (Figuras 1A, 1B) e fungos (Figuras 1C, 1D), a análise de PCA utilizou de 8 amostras (S01, S07, S14, S21, W01, W07, W14, W21) e 75 descritores como variáveis de entrada (ecologia bacteriana, ecologia fúngica, análises físico-químicas, perfil de ácidos graxos, análise de ácidos orgânicos e composição de compostos voláteis). A PCA sugeriu considerar os três primeiros componentes principais (CP) (CP1, CP2 e CP3), sendo responsáveis por explicar 82,96% de variância em relação a ecologia bacteriana e 78,47% de variância em relação a ecologia fúngica. Observando a Figura 1A, as amostras de queijo podem ser divididas em três grupos, tendo o primeiro grupo associado as amostras W01 e W07, as quais apresentaram elevados escores positivos (Tabela 5) em CP1 e CP2. Estas amostras estão na fase inicial de maturação, o que justifica a sua associação aos gêneros de bactérias deteriorantes associados, além da composição físico-química, ácidos graxos de cadeia curta também relacionados ao éster etílico de ácido butírico e ao ácido butírico e aos ácidos orgânicos propiônico e cítrico. O segundo grupo está associado as amostras W14 e W21, as quais apresentaram escores positivos em CP1 e negativos em CP2 (Tabela 5), com um período de maturação mais avançado, correspondendo a sua correlação com bactérias do gênero *Leuconostoc*, que promovem a fermentação láctica, resultando também em uma relação com o ácido láctico, além de succínico, acético, e o sódio, que concentra ao longo da fermentação do queijo. Este grupo também apresentou relação com ácidos graxos de cadeia curta e média, com destaque para os ácidos mirístico e palmítico. Já o grupo 3 é associado aos queijos de verão (S01, S07, S14, S21), com escores negativos de CP1 na Tabela 5, apresentando relação entre as bactérias ácido lácticas, a sua fermentação e consequente valores de acidez, teor de gordura e processos de lipólise relacionados aos ácidos graxos insaturados e ésteres voláteis. Observando a Figura 1B, os resultados são divididos em dois grupos associados ao tempo de maturação das amostras. O primeiro grupo, com valores positivos de CP2 é referente aos queijos com maturação em fase inicial, referentes as amostras S01, S07, S14, W01 e W07, associados a presença de bactérias com gêneros considerados deteriorantes, além da composição físico-química e de ácidos graxos de cadeia curta e insaturados, relacionados a matéria-prima utilizada na fabricação dos queijos. Já o segundo grupo está associado a queijos com 14 e 21 dias de maturação (W14, W21 e S21), às bactérias ácido lácticas e aos produtos da fermentação, provenientes principalmente das reações de lipólise e proteólise ocorridas ao longo da maturação, com destaque para os compostos voláteis e acidez das amostras.

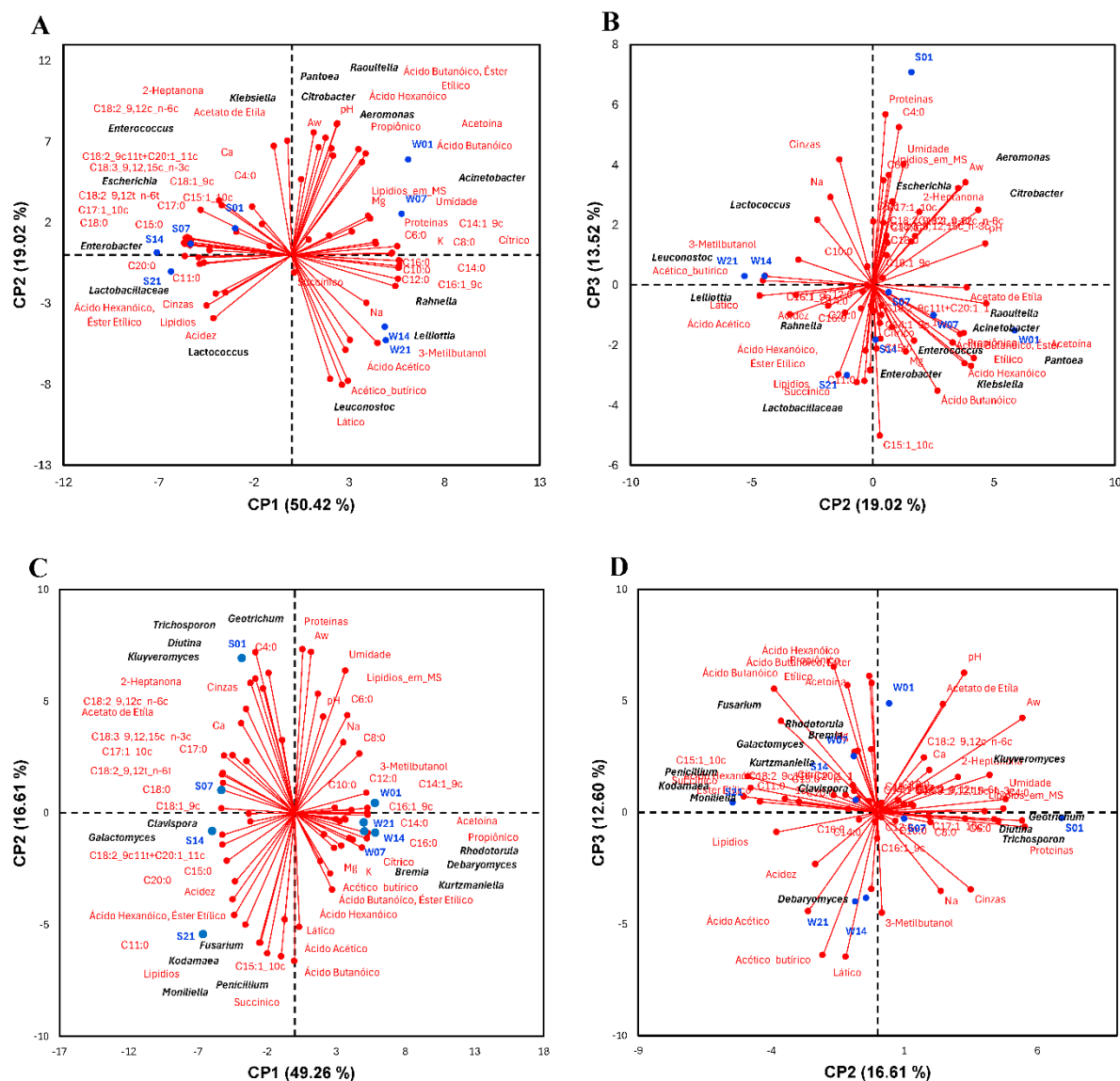
A análise dos componentes principais realizada em relação a ecologia fúngica das amostras de queijos está apresentada nas Figuras 1C, 1D. Na Figura 1C, os resultados foram divididos em três grupos, tendo o primeiro grupo composto pelas amostras de queijo produzidos no inverno (W01, W07, W14 e W21) associados a escores positivos de CP1 e CP2 (Tabela 5). Os dados encontrados neste grupo mostraram uma relação entre as leveduras obtidas nos queijos de inverno que auxiliam na fermentação ácido láctica e nas transformações bioquímicas e sensoriais dos queijos durante a maturação com a composição físico-química das amostras, a composição de ácidos graxos saturados, com destaque para os AGs de cadeia curta e os ácidos palmítico e mirístico, além dos ácidos orgânicos e alguns ácidos carboxílicos voláteis provenientes da lipólise. Já o grupo dois é composto por queijos de verão com 1 e 7 dias de maturação (S01 e S07). Este grupo explicou a relação entre fungos participantes da fermentação inicial dos queijos, com elevadas abundâncias na amostra S01, com os ácidos graxos insaturados. Essa relação, semelhante a observada na Figura 1B, se dá devido a composição inicial da matéria-prima, que apresenta uma concentração de AGs insaturados e a microbiota iniciadora da fermentação. Já o grupo três relaciona os dados de caracterização com os queijos entre 14 e 21 dias de maturação no verão (S14, S21), apresentando uma relação entre fungos não iniciadores de fermentação com reações bioquímicas ocorridas nos lipídios presentes nas amostras. Já a Figura 1D pode ser dividida em quatro grupos distintos, sendo o primeiro associado a amostra W01, com escores positivos de CP1 e CP2 (Tabela 5), explicando a relação entre leveduras do gênero *Kluyveromyces*, associadas ao início da fermentação, com a composição de ácidos graxos insaturados e a composição físico-química, com destaque para a os teores de umidade e Aw. Esta relação é relacionada à composição do leite utilizado e as condições de processo, referentes a prensagem da coalhada. O segundo grupo está associado as amostras de verão S01 e S07, explicando uma relação entre os gêneros *Diutina* e *Geotrichum* e a composição de ácidos graxos de cadeia curta, isto também oriundo principalmente da matéria-prima utilizada, visto que as amostras são do período inicial de maturação. O grupo três apresenta a relação entre as amostras W07, S14 e S21 relacionando a maioria dos gêneros fúngicos com a formação de compostos voláteis oriundos das reações bioquímicas ocorridas na fermentação. Já o grupo quatro é referente as amostras W14 e W21. Este grupo explica a relação entre o gênero *Debaryomyces* com o processo de fermentação do queijo, a partir dos resultados de acidez, composição de ácidos orgânicos láctico, acético, butírico e os processos de lipólise relacionados a composição lipídica das amostras.

Tabela 5. Correlação entre as variáveis e fatores na análise de PCA.

Fatores	Ecologia Bacteriana			Fatores	Ecologia Fúngica		
	CP1	CP2	CP3		CP1	CP2	CP3
Umidade	0,725	0,241	0,631	Umidade	0,690	0,693	0,074
Aw	0,247	0,718	0,537	Aw	0,225	0,785	0,529
Proteínas	0,156	0,101	0,893	Proteínas	0,111	0,797	-0,082
Lipídios	-0,701	-0,262	-0,470	Lipídios	-0,666	-0,544	-0,111
Lipídios em MS	0,345	0,126	0,575	Lipídios em MS	0,318	0,581	0,005
Cinzas	-0,615	-0,256	0,656	Cinzas	-0,654	0,506	-0,432
K	0,928	0,012	-0,138	K	0,918	-0,171	0,095
Na	0,691	-0,323	0,458	Na	0,662	0,343	-0,442
Ca	-0,841	0,298	0,225	Ca	-0,838	0,280	0,236
Mg	0,706	0,258	-0,350	Mg	0,743	-0,123	0,339
Acidez	-0,788	-0,341	-0,111	Acidez	-0,807	-0,335	-0,291
pH	0,415	0,871	0,216	pH	0,389	0,470	0,783
C4:0	-0,277	0,204	0,825	C4:0	-0,352	0,682	0,020
C6:0	0,773	0,085	0,547	C6:0	0,718	0,476	-0,035
C8:0	0,921	0,007	0,332	C8:0	0,884	0,288	-0,057
C10:0	0,992	-0,039	0,095	C10:0	0,977	0,097	-0,048
C11:0	-0,860	-0,019	-0,448	C11:0	-0,837	-0,421	0,059
C12:0	0,998	-0,041	-0,001	C12:0	0,991	0,023	-0,028
C14:0	0,995	-0,075	-0,037	C14:0	0,992	-0,011	-0,057
C14:1	0,777	0,071	-0,159	C14:1	0,775	0,014	0,035
C15:0	-0,938	0,063	-0,283	C15:0	-0,917	-0,235	0,096
C15:1	-0,202	0,056	-0,790	C15:1	-0,182	-0,699	0,202
C16:0	0,988	-0,088	-0,125	C16:0	0,993	-0,099	-0,040
C16:1	0,984	-0,162	-0,015	C16:1	0,988	0,000	-0,146
C17:0	-0,968	0,116	0,219	C17:0	-0,981	0,185	0,044
C17:1	-0,934	0,084	0,324	C17:1	-0,955	0,279	-0,023
C18:0	-0,979	0,112	0,154	C18:0	-0,987	0,113	0,067
C18:1n-9	-0,995	0,078	0,035	C18:1n-9	-0,992	0,022	0,053
C18:2n-6t	-0,955	0,107	0,256	C18:2n-6t	-0,973	0,193	0,038

C18:2n-6	-0,648	0,329	0,255	C18:2n-6	-0,650	0,252	0,307
C18:3n-3	-0,944	0,109	0,226	C18:3n-3	-0,969	0,146	0,045
C20:0	-0,989	-0,011	-0,109	C20:0	-0,977	-0,156	0,019
C18:2c9t11 (CLA) + C20:1	-0,985	0,071	-0,110	C18:2c9t11 (CLA) + C20:1	-0,977	-0,108	0,073
Ácido Cítrico	0,975	0,057	-0,201	Ácido Cítrico	0,984	-0,125	0,120
Ácido Láctico	0,465	-0,869	-0,057	Ácido Láctico	0,486	-0,295	-0,801
Ácido Succínico	0,022	-0,120	-0,510	Ácido Succínico	-0,001	-0,722	0,088
Ácido Acético/Butírico	0,518	-0,844	0,021	Ácido Acético/Butírico	0,540	-0,171	-0,810
Ácido Propiônico	0,617	0,704	-0,253	Ácido Propiônico	0,613	-0,043	0,764
3-Metilbutanol	0,539	-0,569	0,131	3-Metilbutanol	0,548	0,024	-0,564
Ácido Acético	0,498	-0,637	-0,157	Ácido Acético	0,511	-0,375	-0,554
Ácido Butanóico	0,088	0,503	-0,555	Ácido Butanóico	0,066	-0,557	0,692
Ácido Hexanóico	0,368	0,711	-0,413	Ácido Hexanóico	0,350	-0,235	0,817
Acetato de Etila	-0,167	0,727	-0,015	Acetato de Etila	-0,168	0,355	0,607
Ácido Butanóico, Éster Etilico	0,651	0,618	-0,304	Ácido Butanóico, Éster Etilico	0,634	-0,160	0,712
Ácido Hexanóico, Éster Etilico	-0,812	-0,054	-0,345	Ácido Hexanóico, Éster Etilico	-0,816	-0,499	0,075
Acetoína	0,684	0,676	-0,259	Acetoína	0,679	-0,030	0,725
2-Heptanona	-0,672	0,362	0,381	2-Heptanona	-0,721	0,436	0,197
<i>Acinetobacter</i>	0,557	0,152	-0,222	<i>Bremia</i>	0,403	-0,105	0,343
<i>Aeromonas</i>	0,382	0,661	0,506	<i>Clavispora</i>	-0,620	-0,004	0,044
<i>Citrobacter</i>	0,203	0,818	0,391	<i>Debaryomyces</i>	0,563	-0,032	-0,430
<i>Enterobacter</i>	-0,758	0,031	-0,335	<i>Diutina</i>	-0,597	0,634	-0,040
<i>Enterococcus</i>	-0,368	0,321	-0,292	<i>Fusarium</i>	-0,133	-0,520	0,512
<i>Escherichia</i>	-0,514	0,153	0,437	<i>Galactomyces</i>	-0,599	-0,043	0,062
<i>Klebsiella</i>	-0,040	0,761	-0,426	<i>Geotrichum</i>	-0,529	0,783	-0,047
<i>Lactobacillaceae</i>	-0,850	-0,063	-0,503	<i>Kluyveromyces</i>	-0,427	0,606	0,210
<i>Lactococcus</i>	-0,723	-0,425	0,340	<i>Kodamaea</i>	-0,478	-0,633	0,059
<i>Lelliottia</i>	0,792	-0,589	-0,054	<i>Kurtzmaniella</i>	0,793	-0,132	0,151
<i>Leuconostoc</i>	0,355	-0,829	0,046	<i>Moniliella</i>	-0,461	-0,633	0,060
<i>Pantoea</i>	0,312	0,781	-0,383	<i>Penicillium</i>	-0,370	-0,685	0,137

Figura 2. Análise dos Componentes Principais (PCA) relacionando os resultados de ecologia bacteriana (A, B) e ecologia fúngica (C, D) com as análises físico-químicas e químicas realizadas no Queijo Colonial Artesanal (QCA).



4. CONCLUSÃO

Os dados reportados contribuem para a descrição dos padrões de identidade e qualidade relacionados ao queijo colonial artesanal, além de promoverem discussões a respeito da sua ecologia microbiana e as complexas reações bioquímicas que ocorrem durante o seu processo de maturação durante as variações sazonais. As amostras de QCA analisadas apresentaram influência da sazonalidade em seus resultados físicos, químicos e microbiológicos. Para isso, as bactérias ácido lácticas e leveduras apresentaram grande contribuição na maturação dos queijos, com impacto na formação de aromas, acidificação e composição de AGs. Estes dados em conjunto podem levantar a discussão sobre as características específicas para queijos dessa região, auxiliando na caracterização das amostras para possíveis estudos de indicação geográfica do produto.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, vol. 215, nº 3, p. 403–410, out. 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- ANDREWS, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acesso em: 02 fev. 2024.
- AOAC. **Official Methods Association of Official Analytical Chemists. AOAC Method 968.11**. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2000.
- AOAC. **Official Methods Association of Official Analytical Chemists. AOAC Method 935.42**. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2002a.
- AOAC. **Official Methods Association of Official Analytical Chemists. AOAC Method 920.124**. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2002b.
- AOAC. **Official Methods Association of Official Analytical Chemists. AOAC Method 2007.06:2019**. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2019a.
- AOAC. **Official Methods Association of Official Analytical Chemists. AOAC Method 2011.03:2019**. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2019b.
- AOAC. **Official Methods Association of Official Analytical Chemists. AOAC Method 2004.02:2019**. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2019c.

- BALTHAZAR, C. F.; CONTE JÚNIOR, C. A.; MORAES, J.; COSTA, M. P.; RAICES, R. S. L.; FRANCO, R. M.; CRUZ, A. G.; SILVA, A. C. O. Physicochemical evaluation of sheep milk yogurts containing different levels of inulin. **Journal of Dairy Science**, vol. 99, nº 6, p. 4160–4168, jun. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10072>.
- BATISTA, A. L. D.; SILVA, R.; CAPPATO, L. P.; FERREIRA, M. V. S.; NASCIMENTO, K. O.; SCHMIELE, M.; ESMERINO, E. A.; BALTHAZAR, C. F.; SILVA, H. L. A.; MORAES, J.; PIMENTEL, T. C.; FREITAS, M. Q.; RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour. **Journal of Functional Foods**, vol. 38, p. 242–250, 1 nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.09.037>
- BELLEGGIA, L.; FERROCINO, I.; RITA CORVAGLIA, M.; CESARO, C.; MILANOVIĆ, V.; CARDINALI, F.; GAROFALO, C.; COCOLIN, L.; AQUILANTI, L.; OSIMANI, A. Profiling of autochthonous microbiota and characterization of the dominant lactic acid bacteria occurring in fermented fish sausages. **Food Research International**, vol. 154, p. 110990, abr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.110990>
- BEMFEITO, R. M.; RODRIGUES, J. F.; SILVA, J. G. e; ABREU, L. R. Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**, vol. 99, nº 10, p. 7886–7897, out. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11056>
- BENINCÁ, T. Queijo colonial artesanal no Vale do Taquari: numa perspectiva social, sanitária e microbiológica. 2021. **Dissertação** (Mestrado em Ambiente e Sustentabilidade) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, 2021, São Francisco de Paula, RS.
- BERTUZZI, A. S.; MCSWEENEY, P. L. H.; REA, M. C.; KILCAWLEY, K. N. Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 17, nº 2, p. 371–390, 27 mar. 2018. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12332>
- BEZERRA, D. A. F. V. A. Tempo de maturação altera o teor de peptídeos bioativos e o perfil de ácidos graxos do queijo de coalho artesanal. 2022. **Dissertação** (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2022, Natal, RN.
- BIZZO, H.; BARBOZA, E.; SANTOS, M.; GAMA, P. Um conjunto de planilhas eletrônicas para identificação e quantificação de constituintes de óleos essenciais. **Química Nova**, vol. 43, n. 1, pag. 98-115, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170458>
- BRANDIELLI, M. C. Queijo regional do sudoeste do Paraná durante a maturação: caracterização microbiológica, química e física. 2016. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016, Londrina, PR.
- BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, n. 48, de 11 de março de 1996.
- BRASIL. Instrução Normativa – IN nº 75, de 08 de outubro de 2020. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, n. 195, de 09 de outubro de 2020.

BRASIL. Instrução Normativa – IN nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União**, n. 126, de 06 de julho de 2022.

BRUGNEROTTO, P.; DELLA BETTA, F.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; OLIVEIRA COSTA, A. C. A capillary electrophoresis method to determine aliphatic organic acids in bracatinga honeydew honey and floral honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 82, p. 103243, set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103243>

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, vol. 6, nº 8, p. 1621–1624, 8 ago. 2012. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>

CARDOSO, M. F. Identificação e quantificação de fungos em queijo colonial utilizando a região ITS1 do gene ITS. 2021. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2021, Florianópolis, SC.

CARDOSO, V. M.; BORELLI, B. M.; LARA, C. A.; SOARES, M. A.; PATARO, C.; BODEVAN, E. C.; ROSA, C. A. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, vol. 69, p. 331–340, mar. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.040>

CARNEIRO, G. B. Aplicação de quitosana para controle microbiológico em queijo colonial artesanal. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2021, Francisco Beltrão, PR.

CARO, I.; QUINTO, E. J.; FUENTES, L.; ALESSANDRIA, V.; COCOLIN, L. S.; REDONDO-DEL-RÍO, M. P.; MAYO, B.; FLÓREZ, A. B.; MATEO, J. Characterization of Lactococcus strains isolated from artisanal Oaxaca cheese. **LWT**, vol. 122, p. 109041, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109041>

CARVALHO, M. D. M.; LINDNER, J. D. D.; FARIÑA, L. O. A produção de queijo colonial artesanal no município de seara, estado de santa catarina, frente à legislação brasileira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, vol. 70, nº 5, p. 253, 10 nov. 2016. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v70i5.463>

CARVALHO, M. M.; DE FARIÑA, L. O.; STRONGIN, D.; FERREIRA, C. L. L. F.; LINDNER, J. D. D. Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal of Dairy Science**, vol. 102, nº 11, p. 9711–9720, nov. 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16373>

CASARIL, K. B. P. B.; BENTO, C. B. P.; HENNING, K.; PEREIRA, M.; DIAS, V. A. Qualidade microbiológica de salames e queijos coloniais produzidos e comercializados na região sudoeste do paraná. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, vol. 7, nº 2, 26 jun. 2017. <https://doi.org/10.21206/rbas.v7i2.416>

- CASTRO, P. G. M. Desenvolvimento de processo fermentativo para a produção de ácido propiônico a partir da fração hemicelulósica de bagaço de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). 2014. **Dissertação** (Mestrado em Profissional em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014. Rio de Janeiro, RJ.
- CELANO, G.; CALASSO, M.; COSTANTINO, G.; VACCA, M.; RESSA, A.; NIKOLOUDAKI, O.; DE PALO, P.; CALABRESE, F. M.; GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M. Effect of Seasonality on Microbiological Variability of Raw Cow Milk from Apulian Dairy Farms in Italy. **Microbiology Spectrum**, vol. 10, nº 5, 26 out. 2022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00514-22>
- CHEN, J.; LIU, H. Nutritional Indices for Assessing Fatty Acids: A Mini-Review. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, nº 16, p. 5695, 8 ago. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21165695>
- CHOI, J.; LEE, S. I.; RACKERBY, B.; GODDIK, L.; FROJEN, R.; HA, S.-D.; KIM, J. H.; PARK, S. H. Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses. **Journal of Dairy Science**, vol. 103, nº 5, p. 4026–4042, maio 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17455>
- COCK, P. J. A.; ANTAO, T.; CHANG, J. T.; CHAPMAN, B. A.; COX, C. J.; DALKE, A.; FRIEDBERG, I.; HAMELRYCK, T.; KAUFF, F.; WILCZYNSKI, B.; DE HOON, M. J. L. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, vol. 25, nº 11, p. 1422–1423, 1 jun. 2009. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>
- COELHO, M. C.; MALCATA, F. X.; SILVA, C. C. G. Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. **Foods**, vol. 11, nº 15, p. 2276, 29 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>
- COLLINS, Y. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**, vol. 13, nº 11, p. 841–866, jan. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00109-2)
- DAROIT, D.; RIBAS, M. M. Microbiological evaluation of Colonial cheeses produced in Roque Gonzales, Northwest of Rio Grande do Sul state, Brazil. **Journal of Veterinary Science and Public Health**, 9(1), 2022. <https://doi.org/10.4025/revcivet.v9i1.61713>
- DE ANTÔNIO, M. B.; BORELLI, B. A importância das bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos Minas artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, vol. 75, nº 3, p. 204–221, 25 dez. 2020. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v75i3.799>
- DELGADO, F. J.; GONZÁLEZ-CRESPO, J.; CAVA, R.; GARCÍA-PARRA, J.; RAMÍREZ, R. Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. **Food Chemistry**, vol. 118, nº 1, p. 182–189, jan. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.081>
- DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Applied and**

Environmental Microbiology, vol. 72, nº 7, p. 5069–5072, jul. 2006.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>

DORES, M. T.; DIAS, R. S.; ARCURI, E. F.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L.L. F. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from Artisan Minas cheese from the Serra da Canastra - MG, Brazil. **Food Science and Technology**, vol. 33, nº 2, p. 271–275, 10 maio 2013. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000033>

DOUBLIER, S.; CIRRINCIONE, S.; SCARDACI, R.; BOTTA, C.; LAMBERTI, C.; GIUSEPPE, F. Di; ANGELUCCI, S.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; PESSIONE, E. Putative probiotics decrease cell viability and enhance chemotherapy effectiveness in human cancer cells: role of butyrate and secreted proteins. **Microbiological Research**, vol. 260, p. 127012, jul. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127012>

DUDLEY, E. G.; STEELE, J. L. Succinate production and citrate catabolism by Cheddar cheese nonstarter lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 98, nº 1, p. 14–23, jan. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02440.x>

ERHARDT, M. M.; OLIVEIRA, W. de C.; FRÖDER, H.; MARQUES, P. H.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; RICHARDS, N. S. P. dos S. Lactic Bacteria in Artisanal Cheese: Characterization through Metagenomics. **Fermentation**, vol. 9, nº 1, p. 41, 3 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION9010041/S1>

FONTANELI, R. S.; FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P.; CASTRO, R. L.; JUNIOR, A. do N.; CAIERÃO, E.; BIAZUS, V.; ARAÚJO, E. M. Produção de alimentos no inverno para alimentação de vacas leiteiras. **Revista Plantio Direto & Tecnologia Agrícola**, vol. 162, p. 22–36, 2018. Disponível em: <https://www.plantiodireto.com.br/artigos/171>. Acessado em: 15 jan. 2024.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. Overview of Cheese Manufacture. **Fundamentals of Cheese Science**. Boston, MA: Springer US, 2017b. p. 11–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_2

FRÖHLICH-WYDER, M.-T.; BISIG, W.; GUGGISBERG, D.; JAKOB, E.; TURGAY, M.; WECHSLER, D. Cheeses With Propionic Acid Fermentation. **Cheese**. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 889–910. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00035-1>

GERONIKOU, A.; SRIMAHAEAK, T.; RANTSIOU, K.; TRIANTAFILLIDIS, G.; LARSEN, N.; JESPERSEN, L. Occurrence of Yeasts in White-Brined Cheeses: Methodologies for Identification, Spoilage Potential and Good Manufacturing Practices. **Frontiers in Microbiology**, vol. 11, 15 out. 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582778>

GRILLE, L.; ESCOBAR, D.; MÉNDEZ, M. N.; ADRIEN, M. de L.; OLAZABAL, L.; RODRÍGUEZ, V.; PELAGGIO, R.; CHILIBROSTE, P.; MEIKLE, A.; DAMIÁN, J. P. Different Conditions during Confinement in Pasture-Based Systems and Feeding Systems Affect the Fatty Acid Profile in the Milk and Cheese of Holstein Dairy Cows. **Animals**, vol. 13, no 8, p. 1426, 21 abr. 2023. <https://doi.org/10.3390/ani13081426>

GRYGIER, A.; MYSZKA, K.; JUZWA, W.; BIAŁAS, W.; RUDZIŃSKA, M. *Galactomyces geotrichum* mold isolated from a traditional fried cottage cheese produced omega-3 fatty acids.

International Journal of Food Microbiology, vol. 319, p. 108503, abr. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108503>

Hartman, L.; Lago, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids.
Laboratory Practice, 222, 475–476, 1973.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** (4th ed.).
 Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IANNI, A.; BENNATO, F.; MARTINO, C.; GROTTA, L.; MARTINO, G. Volatile Flavor Compounds in Cheese as Affected by Ruminant Diet. **Molecules**, vol. 25, no 3, p. 461, 22 jan. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25030461>

IOANNIDOU, M. D.; MAGGIRA, M.; SAMOURIS, G. Physicochemical Characteristics, Fatty Acids Profile and Lipid Oxidation during Ripening of Graviera Cheese Produced with Raw and Pasteurized Milk. **Foods**, vol. 11, no 14, p. 2138, 19 jul. 2022.
<https://doi.org/10.3390/foods11142138>

ISO. **ISO 15214:1998** | Microbiology of food and animal feed stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 °C. Geneva: International Organization for Standardization, 1998.

ISO. **ISO 6611|IDF 94: 2004** | Milk and milk products – Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds – colony-count technique at 25°C. Geneva: International Organization for Standardization, 2004.

ISO. **ISO 3433|IDF 222: 2008** | Cheese – Determination of fat content – Van Gulik Method. Geneva: International Organization for Standardization, 2008.

ISO. **ISO 4833-1: 2015** | Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. Geneva: International Organization for Standardization, 2015.

ISO. **ISO 21528-2: 2020** | Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count technique. Geneva: International Organization for Standardization, 2020.

ISO. **ISO 6888-1: 2021** | Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Method using Baird-Parker agar medium. Geneva: International Organization for Standardization, 2021.

ISO. **ISO/TC 16649-2: 2022** | Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. Geneva: International Organization for Standardization, 2022.

KALAIČ, P. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. **Food Chemistry**, vol. 125, no 2, p. 307–317, mar. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.077>

KAMIMURA, B. A.; MAGNANI, M.; LUCIANO, W. A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; PIMENTEL, T. C.; ALVARENGA, V. O.; PELEGRINO, B. O.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 18, no 5, p. 1636–1657, 1 set. 2019. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12486>

KAMIMURA, B. A.; DE FILIPPIS, F.; SANT'ANA, A. S.; ERCOLINI, D. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, vol. 80, p. 40–49, 1 jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.12.014>

KARALI, F.; GEORGALA, A.; MASSOURAS, T.; KAMINARIDES, S. Volatile compounds and lipolysis levels of Kopanisti, a traditional Greek raw milk cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 93, no 8, p. 1845–1851, 6 jun. 2013. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5978>

KHAN, A.; NADEEM, M.; IMRAN, M.; GULZAR, N.; AHMAD, M. H.; TAYYAB, M.; RAHIM, M. A.; AWUCHI, C. G. Impact of safflower oil derived conjugated linoleic acid supplementation on fatty acids profile, lipolysis and sensory properties of cheddar cheese. **International Journal of Food Properties**, vol. 25, no 1, p. 2223–2236, 31 dez. 2022. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2130356>

KILCAWLEY, K. N. Cheese Flavour. Fundamentals of Cheese Science. Boston, MA: Springer US, 2017. p. 443–474. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_13

KILCAWLEY, K.; FAULKNER, H.; CLARKE, H.; O'SULLIVAN, M.; KERRY, J. Factors Influencing the Flavour of Bovine Milk and Cheese from Grass Based versus Non-Grass Based Milk Production Systems. **Foods**, vol. 7, no 3, p. 37, 13 mar. 2018. <https://doi.org/10.3390/foods7030037>

KOIDE, G. B. Caracterização microbiológica do queijo Colonial artesanal de Seara-SC baseada em metodologias clássicas e metataxonômica. 2022. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2022, Florianópolis, SC.

KOTHE, C. I.; MOHELLIBI, N.; RENAULT, P. Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics. **Food Research International**, vol. 157, p. 111265, jul. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111265>.

LAURINDO, J.; TONIAL, I. B.; PRADO, N. V. do; MORÉS, S.; CISLAGHI, F. P. C. Composição proximal, cor e qualidade lipídica de queijo azul fresco e maturado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, vol. 72, no 3, p. 163–173, 28 ago. 2017. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v72i3.613>

LI, Y.; HUANG, Y.; LIANG, H.; WANG, W.; LI, B.; LIU, T.; HUANG, Y.; ZHANG, Z.; QIN, Y.; ZHOU, X.; WANG, R.; HUANG, T. The roles and applications of short-chain fatty acids derived from microbial fermentation of dietary fibers in human cancer. **Frontiers in Nutrition**, vol. 10, 8 ago. 2023. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1243390>

- LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 61, no 1, p. 266–272, fev. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000100037>
- LOUVATEL, K.; DEGENHARDT, R. **Caracterização bromatológica de queijos coloniais produzidos no distrito de Santa Lucia, município de Ouro, SC**. Jornada Integrada Em Biologia. [S. l.: s. n.], 2016. p. 37–46.
- MANZO; SANTINI; PIZZOLONGO; AIELLO; MARRAZZO; MECA; DURAZZO; LUCARINI; ROMANO. Influence of Ripening on Chemical Characteristics of a Traditional Italian Cheese: Provolone del Monaco. **Sustainability**, vol. 11, no 9, p. 2520, 30 abr. 2019. <https://doi.org/10.3390/su11092520>
- MARILLEY, L. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 90, no 2, p. 139–159, 15 jan. 2004. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00304-0)
- MARTIN, J. G. P.; SILVA, J. M. M.; CÉSAR, I. C. da R.; DA SILVA, M.; SANTANA, S. A.; VELOSO, T. G. R.; SILVA, J. G. e; FERREIRA, C. L. de L. F.; LEECH, J.; COTTER, P. D. Seasonal variation in the Canastra cheese mycobiota. **Frontiers in Microbiology**, vol. 13, 3 fev. 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1076672>
- MARTINS, M. C. de F.; FREITAS, R. de; DEUVAUX, J. C.; ELLER, M. R.; NERO, L. A.; CARVALHO, A. F. de. Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Food Research International**, vol. 108, p. 295–300, jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.060>
- MASELLA, A. P.; BARTRAM, A. K.; TRUSZKOWSKI, J. M.; BROWN, D. G.; NEUFELD, J. D. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **BMC Bioinformatics**, vol. 13, nº 1, p. 31, 14 dez. 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-31>
- MATERA, J.; LUNA, A. S.; BATISTA, D. B.; PIMENTEL, T. C.; MORAES, J.; KAMIMURA, B. A.; FERREIRA, M. V. S.; SILVA, H. L. A.; MATHIAS, S. P.; ESMERINO, E. A.; FREITAS, M. Q.; RAICES, R. S. L.; QUITÉRIO, S. L.; SANT'ANA, A. S.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Brazilian cheeses: A survey covering physicochemical characteristics, mineral content, fatty acid profile and volatile compounds. **Food Research International**, vol. 108, p. 18–26, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.03.014>
- MELO, M. T. P.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; PIMENTEL, P. R. S.; CALDEIRA, L. A.; RUAS, J. R. M.; CHAMONE, J. M. A.; SILVA, F. V. e; LANNA, D. P. D.; SOARES, C. Composição de ácidos graxos do queijo e leite de vacas alimentadas com casca de banana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 70, nº 3, p. 965–974, jun. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9476>
- MURTAZA, M. A.; ANEES-UR-REHMAN, M.; HAFIZ, I.; AMEER, K.; CELIK, O. F. Effects of probiotic adjuncts on physicochemical properties, organic acids content, and

proteolysis in cheese prepared from buffalo milk. **Journal of Food Processing and Preservation**, vol. 46, nº 3, 6 mar. 2022. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16385>

NATRELLA, G.; GAMBACORTA, G.; FACCIA, M. Volatile organic compounds throughout the manufacturing process of Mozzarella di Gioia del Colle PDO cheese. **Czech Journal of Food Sciences**, vol. 38, nº 4, p. 215–222, 31 ago. 2020. <https://doi.org/10.17221/129/2020-CJFS>

O'CALLAGHAN, T. F.; HENNESSY, D.; MCAULIFFE, S.; KILCAWLEY, K. N.; O'DONOVAN, M.; DILLON, P.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Effect of pasture versus indoor feeding systems on raw milk composition and quality over an entire lactation. **Journal of Dairy Science**, vol. 99, nº 12, p. 9424–9440, dez. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10985>

O'CALLAGHAN, T. F.; MANNION, D. T.; HENNESSY, D.; MCAULIFFE, S.; O'SULLIVAN, M. G.; LEEUWENDAAL, N.; BERESFORD, T. P.; DILLON, P.; KILCAWLEY, K. N.; SHEEHAN, J. J.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Effect of pasture versus indoor feeding systems on quality characteristics, nutritional composition, and sensory and volatile properties of full-fat Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, vol. 100, nº 8, p. 6053–6073, ago. 2017. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12508>

OLIVO, P. M. Perfil de ácidos graxos do queijo maturado produzido com *Lactobacillus helveticus* e utilização de cobertura comestível. 2019. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, 2019, Maringá, PR.

OSMARI, E. K.; CECATO, U.; MACEDO, F. A. F.; SOUZA, N. E. Nutritional quality indices of milk fat from goats on diets supplemented with different roughages. **Small Ruminant Research**, vol. 98, nº 1–3, p. 128–132, 1 jun. 2011. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2011.03.030>

O'SULLIVAN, O.; COTTER, P. D. Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition**, vol. 1, p. 301–316, 1 jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00012-0>

PANTHI, R. R.; JORDAN, K. N.; KELLY, A. L.; SHEEHAN, J. J. (Diarmuid). Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. **Cheese**. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 23–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00002-8>

PASZCZYK, B. Cheese and Butter as a Source of Health-Promoting Fatty Acids in the Human Diet. **Animals**, vol. 12, nº 23, p. 3424, 5 dez. 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12233424>

PASZCZYK, B.; ŁUCZYŃSKA, J. The Comparison of Fatty Acid Composition and Lipid Quality Indices in Hard Cow, Sheep, and Goat Cheeses. **Foods**, vol. 9, nº 11, p. 1667, 15 nov. 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9111667>

PINO, A.; LIOTTA, L.; CAGGIA, C.; CHIOFALO, V.; DE NARDO, F.; ZUMBO, A.; TODARO, A.; RANDAZZO, C. L. Effect of seasonality on physico-chemical and microbiological properties of nicastrese milk and artisanal cheese. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 368, nº 10, 3 jun. 2021. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab055>

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, vol. 41, nº D1, p. D590–D596, 27 nov. 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

RANGEL-ORTEGA, S. del C.; CAMPOS-MÚZQUIZ, L. G.; CHARLES-RODRIGUEZ, A. V.; CHÁVEZ-GONZALÉZ, M. L.; PALOMO-LIGAS, L.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; SOLANILLA-DUQUE, J. F.; FLORES-GALLEGOS, A. C.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. Biological control of pathogens in artisanal cheeses. **International Dairy Journal**, vol. 140, p. 105612, maio 2023. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105612>

RITZENTHALER, K. L.; MCGUIRE, M. K.; SHULTZ, T. D.; FALEN, R.; DASGUPTA, N.; MCGUIRE, M. A. Estimation of Conjugated Linoleic Acid Intake by Written Dietary Assessment Methodologies Underestimates Actual Intake Evaluated by Food Duplicate Methodology. **The Journal of Nutrition**, vol. 131, nº 5, p. 1548–1554, maio 2001. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1548>

ROLDAN, B. B.; AMBROSINI, L. B.; BREMM, C.; KROEFF, D. R. Characterization of colonial cheese: appreciation a traditional product from southern Brazil. **Ciência Rural**, vol. 53, nº 9, 2023. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220277>

SÁNCHEZ-GAMBOA, C.; HICKS-PÉREZ, L.; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N.; HEREDIA, N.; GARCÍA, S.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. Microbiological Changes during Ripening of Chihuahua Cheese Manufactured with Raw Milk and Its Seasonal Variations. **Foods**, vol. 7, nº 9, p. 153, 17 set. 2018. <https://doi.org/10.3390/foods7090153>

SANT'ANNA, F. M.; WETZELS, S. U.; CICCIO, S. H. S.; FIGUEIREDO, R. C.; SALES, G. A.; FIGUEIREDO, N. C.; NUNES, C. A.; SCHMITZ-ESSER, S.; MANN, E.; WAGNER, M.; SOUZA, M. R. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**, vol. 82, p. 349–362, set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.016>

SCHMIDT, P.-A.; BÁLINT, M.; GRESHAKE, B.; BANDOW, C.; RÖMBKE, J.; SCHMITT, I. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 65, p. 128–132, out. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.014>

SERAGLIO, S. K. T.; SCHULZ, M.; NEHRING, P.; DELLA BETTA, F.; VALESE, A. C.; DAGUER, H.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food Chemistry**, vol. 239, p. 649–656, 15 jan. 2018. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.06.118

SERRAPICA, F.; UZUN, P.; MASUCCI, F.; NAPOLITANO, F.; BRAGHIERI, A.; GENOVESE, A.; SACCHI, R.; ROMANO, R.; BARONE, C. M. A.; DI FRANCA, A. Hay or silage? How the forage preservation method changes the volatile compounds and sensory properties of Caciocavallo cheese. **Journal of Dairy Science**, vol. 103, nº 2, p. 1391–1403, fev. 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17155>

SIURANA, A.; CALSAMIGLIA, S. A metaanalysis of feeding strategies to increase the content of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy cattle milk and the impact on daily human

consumption. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 217, p. 13–26, jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.04.013>

SOUZA, P. V. de; GRECELLÉ, C. B. Z.; BARRETO, F.; RAMÍREZ-CASTRILLON, M.; VALENTE, P.; COSTA, M. da. Bacteria and yeasts associated to Colonial cheese production chain and assessment of their hydrolytic potential. **Brazilian Journal of Food Technology**, vol. 24, 2021. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.28620>

SOUZA, V. M. de; CALDEIRA, L. A.; ROCHA, V. R.; ANTUNES, A. P. da S.; RUAS, J. R. M.; SANTANA, P. F.; COSTA, N. M.; BORGES, L. D. A. Efeito de níveis crescentes de ureia na alimentação de vacas sobre o rendimento, composição, perfil de ácidos graxos e sensorial do queijo minas frescal. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, vol. 22, nº 2, p. 107–113, 2015. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2015.361>

STRÖHER, J. A.; ERHARDT, M. M.; SANT'ANNA, V.; RICHARDS, N. S. P. dos S.; FRÖDER, H.; SANTOS JÚNIOR, L. C. O. dos; RUIS, M.; PETTER, I. Avaliação das boas práticas agropecuárias de propriedades leiteiras da Serra Gaúcha-RS. **Research, Society and Development**, vol. 10, nº 7, p. e1710715696, 11 jun. 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.15696>

SZUDERA-KOŃCZAL, K.; MYSZKA, K.; KUBIAK, P.; DRABIŃSKA, N.; MAJCHER, M. A. The Combined Effect of Lactic Acid Bacteria and *Galactomyces geotrichum* Fermentation on the Aroma Composition of Sour Whey. **Molecules**, vol. 28, nº 11, p. 4308, 24 maio 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28114308>

TETER, A.; BARŁOWSKA, J.; KRÓL, J.; BRODZIAK, A.; RUTKOWSKA, J.; LITWIŃCZUK, Z. Volatile compounds and amino acid profile of short-ripened farmhouse cheese manufactured from the milk of the White-Backed native cow breed. **LWT**, vol. 129, p. 109602, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109602>

TOGAY, S. O.; CAPECE, A.; SIESTO, G.; AKSU, H.; SANDIKCI ALTUNATMAZ, S.; YILMAZ AKSU, F.; ROMANO, P.; KARAGUL YUCEER, Y. Molecular characterization of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses. **Food Science and Technology**, vol. 40, nº 4, p. 871–876, dez. 2020. <https://doi.org/10.1590/fst.24319>

UJLAKI, G.; KOVÁCS, T.; VIDA, A.; KÓKAI, E.; RAUCH, B.; SCHWARCZ, S.; MIKÓ, E.; JANKA, E.; SIPOS, A.; HEGEDŰS, C.; URAY, K.; NAGY, P.; BAI, P. Identification of Bacterial Metabolites Modulating Breast Cancer Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition. **Molecules**, vol. 28, nº 15, p. 5898, 5 ago. 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28155898>

VERRUCK, S.; BALTHAZAR, C. F.; ROCHA, R. S.; SILVA, R.; ESMERINO, E. A.; PIMENTEL, T. C.; FREITAS, M. Q.; SILVA, M. C.; DA CRUZ, A. G.; PRUDENCIO, E. S. **Dairy foods and positive impact on the consumer's health**. Academic Press, 2019. p. 95–164. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.03.002>

WANG, H. H.; GARRUTI, G.; LIU, M.; PORTINCASA, P.; WANG, D. Q.-H. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances in Reverse Cholesterol Transport. **Annals of Hepatology**, vol. 16, p. S27–S42, nov. 2017. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5495>

WANG, Y.; QIAN, P.-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE**, vol. 4, n° 10, p. e7401, 9 out. 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. **PCR Protocols**. Academic Press. (pp. 315-322), 1990.

WOLF, I. V.; PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; ZALAZAR, C. A. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. **Food Research International**, vol. 43, n° 4, p. 1204–1211, mai. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.018>

WOLFE, B. E.; BUTTON, J. E.; SANTARELLI, M.; DUTTON, R. J. Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity. **Cell**, vol. 158, n° 2, p. 422–433, jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>

ZAGO, M.; BARDELLI, T.; ROSSETTI, L.; NAZZICARI, N.; CARMINATI, D.; GALLI, A.; GIRAFFA, G. Evaluation of bacterial communities of Grana Padano cheese by DNA metabarcoding and DNA fingerprinting analysis. **Food Microbiology**, vol. 93, p. 103613, fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103613>

CAPÍTULO 3

Queijo Colonial Artesanal Como Fonte De Bactérias Ácido Láticas Potencialmente Probióticas: Ensaio de Funcionalidade e Segurança

Queijo Colonial Artesanal Como Fonte de Bactérias Ácido Láticas Potencialmente Probióticas: Ensaios de Funcionalidade e Segurança

Artisanal Colonial Cheese as a Source of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria: Functionality and Safety Assays

RESUMO

O queijo colonial artesanal (QCA) é produzido a partir do leite cru bovino, conservando a sua microbiota nativa durante a maturação. O principal grupo de microrganismos que atua na maturação do QCA são as bactérias ácido lácticas (BAL), sendo geralmente seguras para o consumo humano, tendo diversas espécies consideradas probióticas. No entanto, para serem consideradas probióticas, as bactérias precisam ser caracterizadas quanto a sua morfologia, funcionalidade e segurança. Foram isoladas 10 BAL de QCA produzidos por dois diferentes produtores, com tempos de maturação de 14 e 21 dias, e realizadas análises de identificação por microscopia, métodos bioquímicos e identificação genotípica através do gene 16s rRNA. Também foram realizadas análises de auto-agregação e hidrofobicidade por espectrofotometria e sobrevivência ao sistema gastrointestinal *in vitro* para avaliar a capacidade de colonização. Os ensaios de segurança e potencial tecnológico foram realizados avaliando a produção de gelatinase, mucinase, lipase e hemolisina e, também, a atividade antimicrobiana pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) com 7 diferentes antibióticos de uso comum e hospitalar. As cepas isoladas eram Gram-positivas, catalase negativas, identificadas como *Lactocaseibacillus casei* (5 isolados), *Lactiplantibacillus plantarum* (3 isolados), *Levilactobacillus brevis* (1 isolado) e *Pediococcus acidilactici* (1 isolado). Todas as 10 cepas apresentaram alta contagem de bactérias e alta taxa de sobrevivência após a simulação gastrointestinal, além de altas porcentagens de auto-agregação e hidrofobicidade, estando de acordo com o esperado para garantir a sua adesão no hospedeiro e consequente proteção frente a patógenos. As análises de segurança apresentaram ausência da produção de hemolisina, mucinase e gelatinase, considerados fatores de virulência indesejáveis em probióticos. Também se apresentaram sensíveis a, no mínimo, duas classes distintas de antimicrobianos. Dois isolados apresentaram potencial tecnológico com atividade lipolítica. Diante dos resultados encontrados, todos os isolados foram considerados como cepas com potencial probiótico.

Palavras-chave: Atividade lipolítica; Fatores de virulência; Gene 16s rRNA; Propriedades de adesão; Queijo de leite cru; Susceptibilidade a antibióticos.

1. INTRODUÇÃO

Os queijos brasileiros refletem os aspectos históricos e sociais da sua região e produtores, recebendo o nome da localidade de produção devido a sua história e relevância econômica. A região sul do Brasil apresenta alguns queijos tradicionais, com destaque para os queijos Colonial e Serrano (Kamimura et al., 2019). O queijo colonial artesanal (QCA) é oriundo de produtores de descendência europeia, principalmente Portugal, Itália e Alemanha, os quais colonizaram as regiões dos estados do sul do país, denominando de “colônias” os espaços de terras e coloniais os alimentos produzidos (Penna et al., 2021). O QCA, assim como outros queijos artesanais, é produzido a partir do leite cru, conservando a sua microbiota diversa, que inclui microrganismos patogênicos e deteriorantes, inibidos durante a maturação por meio das bactérias ácido lácticas (BAL) (Degenhardt et al., 2023).

As BAL podem atuar no queijo como culturas iniciadoras e não-iniciadoras, durante a fermentação do produto, sendo consideradas seguras para o consumo humano. Dentre as BAL, diversas cepas são utilizadas como microrganismos probióticos (Mohammed; Çon, 2021). Hill et al. (2014) definem como probióticos “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro”. Esse grupo de microrganismos é representado principalmente por bactérias da família *Lactobacillaceae* e do gênero *Bifidobacterium* e tem como principais benefícios o aumento da imunidade, regulação da microbiota e trânsito intestinal, produção de ácidos e ácidos graxos de cadeia curta, exclusão competitiva de patógenos, além de outros efeitos espécie ou cepa-específicos (Hill et al., 2014; Lopes et al., 2023).

No entanto, para que as BAL possam ser consideradas probióticas, as mesmas devem ser capazes de sobreviver em condições baixas de pH, alcançando o intestino, seu local de ação, viáveis (Lakhlifi et al., 2023). Além disso, elas devem ser capazes de aderir a mucosa intestinal, não transferir resistência a antibióticos ou fatores de virulência (Papadimitriou et al., 2015). A partir do exposto, este estudo teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar bactérias ácido lácticas do QCA para avaliar se as mesmas se enquadram como culturas potencialmente probióticas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

As amostras de Queijo Colonial Artesanal (QCA) foram preparadas com leite cru e maturadas por 21 dias em duas propriedades da região sul do Brasil (região oeste de Santa Catarina – Seara/SC). Os produtores (CF e RG) foram selecionados considerando a organização previa do local, possuindo uma queijaria localizada nas propriedades. Foram coletadas oito diferentes amostras, sendo quatro de cada produtor, com tempos de maturação de 1, 7, 14 e 21 dias. As amostras de QCA coletadas nas propriedades foram transportadas em sob refrigeração (7 °C) em uma caixa térmica com gelo reutilizável, na sua embalagem original, sendo mantidas sob congelamento (-18°C) até a realização do isolamento das colônias. Considerando a seletividade de microrganismos que ocorre durante a maturação dos queijos, optou-se por isolar as bactérias ácido lácticas apenas das amostras com 14 e 21 dias de maturação, a fim de reduzir o isolamento de bactérias não ácido lácticas que poderiam estar presentes na matriz.

2.2. ISOLAMENTO DE CEPAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

As cepas com potencial probiótico foram isoladas em ágar MRS após diluição seriada das amostras de queijo de 14 e 21 dias de maturação e inoculação em profundidade com sobrecamada. A partir das espécies isoladas foram selecionadas aquelas com características de bactérias ácido lácticas (BAL), como Gram-positivas, em forma de bacilos ou cocos e catalase-negativas a partir da metodologia descrita por Tanaka et al. (2023). Uma colônia de cada cepa foi corada com kit de coloração de Gram, de acordo com as instruções do fabricante (LaborClin, Pinhais, BR). A morfologia e coloração das bactérias foram analisadas em microscópio óptico. Para o teste de catalase, 10 µL de peróxido de hidrogênio 3% foram adicionados sobre a cultura espalhada em lâmina de vidro, de modo que a formação de bolhas indicou catalase positiva.

2.3. ENSAIOS DE IDENTIDADE

2.3.1. Identificação Genotípica

A identificação de bactérias foi realizada utilizando o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para região V3-V4 do gene 16S rRNA, 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (Wang; Quian, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Caporaso et al., 2012). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). O sequenciamento realizado foi *paired-end* utilizando o kit V3 com 600 ciclos. As análises do sequenciamento foram realizadas utilizando o pipeline Sentinel (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, SC, BR) seguindo as pesquisas de Altschul et al. (1990), Andrews (2010), Cock et al. (2009) e Masella et al. (2012). As sequencias de DNA obtidas foram comparadas com a database Sentinel (Quast et al., 2013) e Greengenes (DeSantis et al., 2006).

2.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das cepas bacterianas foi visualizada com a utilização do microscópio eletrônico de varredura (MEV, JSM 6390 LV, Jeol, Tokio, Japain), utilizando a metodologia de Silva et al. (2017) como referência. As cepas bacterianas foram previamente cultivadas em caldo MRS por 24 horas a 37 °C, lavadas duas vezes com solução salina 0,85%, centrifugadas a 4000 x g por 10 minutos e o sobrenadante retirado. Posteriormente as cepas foram congeladas a -18 °C por 24 h e liofilizadas. Após secas, as cepas foram grudadas individualmente em stubs, com auxílio de fita carbono e revestidas com uma fina camada de ouro com um revestidor de pulverização catódica a vácuo (Leica, EM SCD 500, Wetzlar, DE). Foi utilizada voltagem de aceleração de 8 kV, ampliação de 6.000x, 7.500x e 10.000x e distância de 1 µm e 2µm.

2.4. ENSAIOS DE COLONIZAÇÃO NO HOSPEDEIRO

2.4.1. Sobrevivência ao Sistema Gastrointestinal *In Vitro*

A avaliação da sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas *in vitro* foi realizada em duplicata para as BAL isoladas, simulando as condições típicas predominantes na boca, estômago e intestino (Tabela 1), conforme proposto por Brodkorb et al. (2019). Primeiramente, 1 mL das culturas bacterianas em contagem aproximada de 8 log UFC/mL, seguindo a escala de McFarland 0,5 foram distribuídas em tubos de ensaio estéreis.

Tabela 1. Simulação das condições gastrointestinais para avaliação da resistência de cepas ácido lácticas.

Etapa	Condições simuladas
Fase Oral	Mistura da cultura com SSF (1:1)
	Inclusão do CaCl ₂ (1,5 mM em SSF)
	Adição da amilase salivar (75 U/mL)
	Incubação em agitação (2 min, 37°C, pH 7,0)
Fase Gástrica	Mistura do bolo oral com SGF (1:1)
	Inclusão do CaCl ₂ (0,15 mM em SGF)
	Adição de pepsina (2000 U/mL)
	Incubação em agitação (2 h, 37°C, pH 3,0)
Fase Intestinal	Mistura do bolo gástrico com SIF (1:1)
	Adição da bile (10 mM de sais biliares)
	Inclusão do CaCl ₂ (0,6 mM em SIF)
	Adição de pancreatina (atividade da tripsina de 100 U/mL)
	Incubação em agitação (2 h, 37°C, pH 7,0)

Fonte: Brodkorb et al. (2019).

SGF: fluido gástrico simulado; SIF: fluido intestinal simulado; SSF: fluido salivar simulado.

Foram realizados ajustes de pH com adição de NaOH 0,1 M ou HCl 0,1 M. A temperatura foi mantida em 37±1°C e a intensidade dos movimentos peristálticos foi simulada em banho-maria dubnoff digital (Modelo NI 1232, Nova Instruments, Piracicaba, SP) com agitação variável (Zoldan et al., 2023). Antes do uso, as soluções enzimáticas foram preparadas e esterilizadas por filtração utilizando filtro de membrana de 0,22 µm (MF-Millipore, Billerica, MA, USA). Após a esterilização, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo até o uso nas condições gastrointestinais simuladas. Após, todas as amostras foram submetidas à contagem de células viáveis, sendo inoculadas em duplicata em profundidade com sobrecamada

no ágar MRS e incubadas por 72 horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após a incubação as colônias foram contadas, e o resultado expresso em log unidades formadoras de colônias por mL (Log UFC/mL). Foi realizado o cálculo da taxa de sobrevivência das bactérias (%), conforme descrito por Camelo-Silva et al. (2022), de acordo com a equação (1).

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = (N_1/N_0) \times 100 \quad (1)$$

onde N_1 é a contagem de células viáveis após as etapas de condições gastrointestinais simuladas *in vitro* (log UFC/mL), e N_0 é a contagem inicial de células viáveis (log UFC/mL).

2.4.2. Teste de Auto-Agregação

A determinação da auto-agregação foi realizada seguindo a metodologia de Yasmin et al. (2020). As cepas isoladas foram cultivadas em caldo MRS por 18 horas a 37°C , posteriormente foram separadas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, lavadas duas vezes e suspensas em tampão fosfato salino (pH 7,4) para produzir uma amostra com densidade óptica de 0,5 (A_0) a 600 nm. Em seguida, 2 mL das culturas foram incubadas a 37°C por 3, 6 e 24 horas. Após os respectivos tempos, foi realizada a medição de OD (A_t). A porcentagem de auto-agregação foi expressa, segundo a equação (2).

$$\text{Auto - agregação (\%)} = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

2.4.3. Teste de Hidrofobicidade

O teste de hidrofobicidade foi realizado por meio da adesão bacteriana a hidrocarbonetos (BATH), seguindo a metodologia de Farid et al. (2021). Os isolados foram cultivados em caldo MRS por 24 horas a 37°C e as células foram colhidas por centrifugação a 4000 x g por 15 min. Após, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (pH 7,4) e ressuspensas na mesma solução com absorvância de 0,7 a 600 nm ($\text{OD}_{\text{inicial}}$). Um volume de 3 mL da suspensão foi transferido para um tubo de ensaio e misturado com 1,0 mL de diclorometano, sendo posteriormente incubado por 10 minutos a 37°C . Após o período de

incubação, a mistura foi agitada por 30 s em vórtex e incubada novamente por 1 hora a 37 °C, para separação de fases. A absorbância da fase aquosa foi medida a 600 nm (OD_{final}) e a hidrofobicidade da superfície celular foi calculada utilizando a equação (3).

$$Hidrofobicidade (\%) = \left(\frac{OD_{inicial} - OD_{final}}{OD_{inicial}} \right) \times 100 \quad (3)$$

2.5. ENSAIOS DE SEGURANÇA

2.5.1. Atividade Hemolítica e Produção de Gelatinase

Para a análise da atividade hemolítica e produção de gelatinase, as cepas foram cultivadas em caldo MRS por 18 h a 37°C. A avaliação da atividade hemolítica das cepas isoladas foi realizada de acordo com Margalho et al. (2020). Após cultivo em caldo, as culturas foram estriadas em ágar sangue (ágar triptona de soja com 5% de sangue de carneiro, LaborClin, Pinhais, BR), e novamente incubados a 37°C por 48 horas. Os isolados que exibiram halos esverdeados ao redor das colônias (α -hemólise) foram classificados como com hemólise parcial, não produziram halos de inibição (γ -hemólise) foram classificados como não-hemolíticos. Isolados que produziram halos brilhantes ao redor das colônias (β -hemólise) foram classificados como hemolíticos. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle positivo para β -hemólise.

A produção de gelatinase foi analisada a partir da metodologia de Zhang et al. (2016), a partir da adição de alíquotas de 10 μ L das culturas em ágar Lúria Bertani modificado suplementado com 3% de gelatina (m/v). As placas foram incubadas a 37°C/48 horas e, após a incubação, foram mantidas a 4°C durante 4 horas. A hidrólise da gelatina foi registrada pela formação de halos ao redor das colônias. Foi utilizada cepa de *S. aureus* ATCC 25923 para controle positivo de gelatinase.

2.5.2. Capacidade de Degradação da Mucina

Para a análise da capacidade de degradação da mucina, as cepas foram cultivadas em caldo MRS por 18 h a 37°C. A avaliação da expressão da enzima mucinase por parte das BAL foi realizado com base no trabalho de Leska et al. (2023). As cepas foram inoculadas utilizando 10 uL de cultura na superfície do ágar MRS suplementado com 0,5% de mucina gástrica suína (Tipo III, M1778, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) com 3% ou sem glicose, sendo as placas incubadas por 72 h a 37°C. Após o cultivo, as placas foram coradas com uma solução de verde de malaquita 2% (m/v) em ácido acético 3,5 M por 30 min e lavadas com solução de ácido acético 1,2 M. A degradação da mucina foi positiva quando se observou uma zona clara ao redor da colônia. Foi utilizado *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 como controle positivo, incubada em ágar TSA suplementado com 0,5 % de mucina por 24 h a 37 °C e corado com solução de preto de amido 0,1% (m/v) dissolvido em ácido acético 3,5 M por 30 min, e posteriormente lavado com solução de ácido acético 1,2 M.

2.5.3. Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos

As cepas potencialmente probióticas foram obrigatoriamente testadas quanto ao seu perfil de resistência a antimicrobianos, em, no mínimo, duas classes diferentes de antimicrobianos clinicamente importantes e seus resultados foram expressos em µg/mL. Foram utilizados os valores de corte estabelecidos pelo painel de especialistas em documentos da *European Commission* (EUC) (EUC, 2003), *European Food Safety Authority* (EFSA) (EFSA, 2012), do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (EUCAST, 2021) e no trabalho de Gad et al. (2014). Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados pela técnica de micro diluição em caldo (MIC), conforme descrito na norma técnica ISO 20776-1 (ISO, 2019). Nas microplacas, as diluições dos antibióticos (ampicilina, benzilpenicilina, cefalexina, clindamicina, metronidazol, meropenem e estreptomicina) foram realizadas a fim de ter variações superiores e inferiores a concentração de corte do antibiótico. Na sequência, 90 µL de meio de cultivo caldo MRS (Argyri, et al., 2013) e 10µL do antibiótico diluído foram adicionados nos poços. A Tabela 2 apresenta os antimicrobianos testados, o solvente/diluyente utilizado para cada determinado antimicrobiano e a sua faixa de concentração testada.

Tabela 2. Antimicrobianos, solventes/diluentes e respectivas faixas de concentração utilizadas.

Antimicrobiano	Solvente/Diluyente	Faixas de Concentração (µg/mL)
Ampicilina**	Tampão Fosfato pH 8,0	0,125 – 64
Benzilpenicilina***	Água Destilada	0,125 – 64
Cefalexina****	Tampão Fosfato pH 6,0	0,125 – 64
Clindamicina**	Água Destilada	0,125 – 64
Estreptomicina*/**	Água Destilada	2 – 1024
Meropenem***	Água Destilada	0,125 – 64
Metronidazol***	DMSO/Água Destilada	0,125 – 64

Fonte: Diluentes e faixas de concentração adaptado de ISO 20776-1 (ISO, 2019). CIM adaptado de *EUC (2003); **EFSA (2012); ***EUCAST (2021); ****Gad et al. (2014).

Para adicionar a cultura microbiana a ser testada, a sua concentração foi padronizada em 8 log UFC/mL, de acordo com a leitura comparativa da escala de McFarland 0,5. Os inóculos incubados em caldo MRS por 16 horas a 37°C, foram ajustados em espectrofotômetro (K37-VIS, KASVI, Brasil) a 625 nm para absorbância entre 0,08 e 0,13. Por fim, 10µL do inóculo com concentrações ajustadas foi incorporado nos poços e as microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O desenvolvimento microbiano se confirmou com a adição de 20 µL de uma solução do corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio 0,5% (TTC) seguido de uma hora adicional de incubação (37°C). Além disso, os testes foram realizados com 2 bactérias ácido lácticas padrão para comparação, *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 e *Lacticaseibacillus casei* BGP 93. A CIM foi dada como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu o desenvolvimento de microrganismo, ou seja, não apresentou coloração. Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), o método proposto por Celiktas et al. (2007) foi adotado com algumas modificações. As suspensões que não tiveram desenvolvimento microbiano, ou seja, abaixo da CIM, foram inoculadas (10µL) em superfície em placas de Petri com ágar MRS e incubadas a 37°C por 24 h. Por fim, a menor concentração onde não foi possível observar o desenvolvimento microbiológico foi considerada a CBM.

2.6 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE LIPASE PARA AVALIAÇÃO DE POTENCIAL TECNOLÓGICO

Para a análise da expressão da enzima lipase, as cepas foram cultivadas em caldo MRS por 18 h a 37°C. A produção de lipase foi verificada segundo Barbosa et al. (2010), a partir da adição de alíquotas de 10 µL de cultura sobre a superfície do ágar Luria-Bertani modificado

suplementado com 0,2% (m/v) de CaCl_2 e 1% Tween 80 para lipase. As placas foram incubadas a 37°C/48 horas e, após a incubação, foram mantidas a 4°C durante 4 horas. A produção de lipase foi registrada pela formação de halos ao redor das colônias. Foi utilizada cepa de *Bacillus cereus* ATCC 11778, para controle positivo de lipase.

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica® 14.0.1 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (5% de significância). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

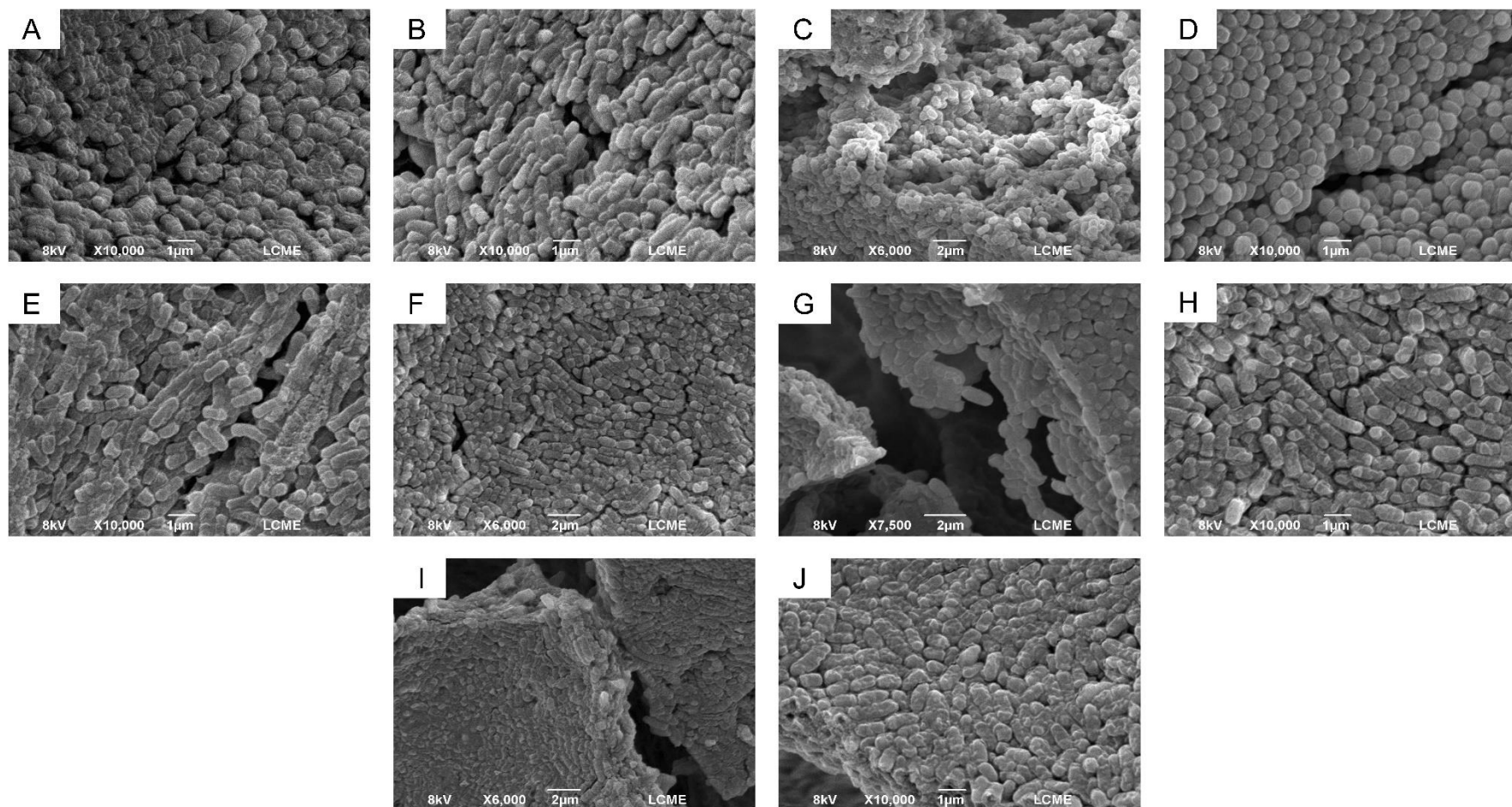
3.1 ENSAIOS DE IDENTIDADE

A seleção das BAL foi realizada a partir do isolamento de culturas típicas, seguindo para a identificação genotípica das cepas a partir do gene 16s rRNA. Todas as cepas isoladas do QCA apresentaram características típicas de BAL. A morfologia das cepas foi realizada com MEV, identificando nove cepas em formato de bacilos e uma cepa em formato de coco, sendo todas Gram-positivas e catalase negativas. A morfologia e disposição das culturas isoladas está apresentado na Figura 1. A codificação e as espécies identificadas genotipicamente estão apresentadas na Tabela 3. A análise genotípica identificou as espécies *L. casei* (5 isolados), *L. plantarum* (3 isolados), *Levilactobacillus brevis* (1 isolado) e *Pediococcus acidilactici* (1 isolado). As figuras apresentam as espécies com morfologia de bacilos em grandes filmes bacterianos representando as cepas da família *Lactobacillaceae*. A Figura 1D mostra a cepa isolada de *P. acidilactici* LAB 04, com morfologia típica de coco, em agrupamento duplo. No geral as células bacterianas apresentam danos à parede celular devido a não utilização de um agente protetor durante a liofilização das culturas, mas permanecendo com seu formato preservado.

Tabela 3. Cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) identificadas oriundas do Queijo Colonial Artesanal (QCA).

Cepa	Código do Produtor	Diluição de Isolamento	Maturação (dias)
<i>L. plantarum</i> LAB 01	CF	10 ⁻⁶	21
<i>L. plantarum</i> LAB 02	RG	10 ⁻⁷	14
<i>L. plantarum</i> LAB 03	CF	10 ⁻⁶	14
<i>P. acidilactici</i> LAB 04	RG	10 ⁻⁶	14
<i>L. brevis</i> LAB 05	CF	10 ⁻⁵	14
<i>L. casei</i> LAB 06	CF	10 ⁻⁵	21
<i>L. casei</i> LAB 07	RG	10 ⁻⁵	21
<i>L. casei</i> LAB 08	CF	10 ⁻⁶	14
<i>L. casei</i> LAB 09	RG	10 ⁻⁶	14
<i>L. casei</i> LAB 10	RG	10 ⁻⁵	21

Figura 1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Bactérias Ácido Láticas (BAL) com potencial probiótico isoladas de Queijo Colonial Artesanal (QCA).



A – *L. plantarum* LAB 01. B – *L. plantarum* LAB 02. C – *L. plantarum* LAB 03. D – *P. acidilactici* LAB 04. E – *L. brevis* LAB 05. F – *L. casei* LAB 06. G – *L. casei* LAB 07. H – *L. casei* LAB 08. I – *L. casei* LAB 09. J – *L. casei* LAB 10.

3.2 ENSAIOS DE COLONIZAÇÃO NO HOSPEDEIRO

3.2.1 Sobrevivência ao Sistema Gastrointestinal *In Vitro*

Para fornecer efeitos positivos a saúde do hospedeiro, um probiótico deve alcançar o intestino em elevados números, além de sobreviver aos fatores de estresse presentes durante a passagem pelo trato gastrointestinal (Ait Chait et al., 2021). A contagem das células sobreviventes em condições iniciais (simulando a dosagem de ingestão), condições gástricas e condições intestinais, além das taxas de sobrevivência das mesmas estão descritas na Tabela 4. De maneira geral, as BAL apresentaram boa sobrevivência ao sistema gastrointestinal simulado, mesmo em condições de baixo pH e sais biliares, com contagens superiores a 7 log UFC/g. A sobrevivência das BAL a passagem pelo trato gastrointestinal está relacionada a alguns mecanismos de proteção dos gêneros, como a presença de F0F1-ATPase na família *Lactobacillaceae* (Ruiz-Moyano et al., 2019). A redução na contagem bacteriana encontrou-se superior ao recomendado por Hill et al. (2014), que cita uma contagem de células viáveis superior a 6 log UFC/g, para promover benefícios a saúde. Segundo Chen et al. (2012), é importante que as bactérias probióticas apresentem uma rápida recuperação frente as condições gástricas, a fim de se manterem viáveis para colonizarem o intestino.

É reportado pela literatura que a resistência a baixos valores de pH e sais biliares é cepa-dependente, sendo favorecidos quando ingeridos com algum alimento, sendo estas protegidas pela matriz alimentícia (Gomand et al., 2019). Também, a literatura informa que alguns tipos de probióticos conseguem apresentar uma maior tolerância aos sais biliares devido a produção da enzima hidrolase de sais biliares (BSH) (Barache et al., 2020). Dentre as cinco cepas de *L. casei* identificadas, três não apresentaram redução ($p > 0,05$) da contagem de células durante a digestão *in vitro* (LAB 06, LAB 09 e LAB 10) e nenhuma apresentou redução da sua taxa de sobrevivência. Entre as cepas de *L. plantarum* avaliadas, apenas a *L. plantarum* LAB 03 não apresentou redução significativa ($p > 0,05$) de suas contagens de células durante a digestão nem variações nas taxas de sobrevivência. *L. plantarum* LAB 01 reduziu ($p < 0,05$) sua contagem nas condições intestinais e *L. plantarum* LAB 02 apresentou redução em todas as condições simuladas. *L. brevis* LAB 05 e *P. acidilactici* LAB 04 variaram ($p < 0,05$) após a etapa gástrica, mas, apenas *L. brevis* apresentou redução da taxa de sobrevivência das células. No trabalho de Ait Chait et al. (2021), com *L. brevis* potencialmente probiótico isolado de queijos artesanais da Argélia, uma cepa isolada apresentou redução inferior a 1 log UFC/g e

outras duas cepas com reduções próximas a 1 log UFC/g, mantendo taxas elevadas de células viáveis após a digestão. Os autores informaram que as variações de contagem microbiana de *L. brevis* são cepa-específicas, podendo ter pouca ou maior variação durante a passagem pelo sistema digestivo (Ait Chait et al., 2021). As cepas de *L. plantarum* e *P. acidilactici* isoladas de QCA estudado por Margalho et al. (2021) apresentaram altas taxas de sobrevivência, entre 75 e 100 %, em concentração de 0,4% de sais biliares e também sobreviveram a valores de pH entre 2,5 e 3,5, sendo estas condições semelhantes as utilizadas neste trabalho. Ainda referente aos dados encontrados por Margalho et al. (2021), os autores citam que aproximadamente ¼ das cepas isoladas dos queijos artesanais brasileiros apresentaram resistência aos sais biliares, podendo ser influenciados pelo isolamento bacteriano.

Acredita-se que além de as cepas isoladas apresentarem naturalmente uma maior capacidade de resistir a baixos valores de pH devido a sua matriz de isolamento ácida (QCA), elas também produzem ácidos orgânicos, necessitando maior resistência para se manterem viáveis na matriz (Margalho et al., 2021). Isso contribuiu para aumentar a sua sobrevivência em pHs inferiores, como o encontrado no sistema gástrico e apresentar baixas porcentagens de perdas durante a digestão.

Tabela 4. Resistencia das cepas de BAL frente as etapas de digestão simulada *in vitro*.

Cepas	Contagem de células sobreviventes (Log UFC/g)			Taxa de Sobrevivência (%)	
	Inicial	Estômago	Intestino	Estômago	Intestino
<i>L. plantarum</i> LAB 01	8,53±0,02 ^{abA}	8,33±0,10 ^{aA}	7,65±0,10 ^{aB}	97,60±1,39 ^{abA}	89,69±1,01 ^{aB}
<i>L. plantarum</i> LAB 02	8,65±0,03 ^{aA}	8,12±0,12 ^{abcB}	7,77±0,02 ^{aC}	93,87±1,03 ^{abA}	89,76±0,47 ^{aB}
<i>L. plantarum</i> LAB 03	8,08±0,40 ^{abA}	8,10±0,14 ^{abcA}	7,69±0,55 ^{aA}	100,37±3,19 ^{aA}	95,12±2,13 ^{aA}
<i>P. acidilactici</i> LAB 04	8,44±0,03 ^{abA}	7,46±0,12 ^{bcB}	7,14±0,09 ^{ab}	88,43±1,72 ^{bA}	84,63±1,38 ^{aA}
<i>L. brevis</i> LAB 05	8,77±0,08 ^{aA}	8,31±0,11 ^{abB}	7,95±0,06 ^{aB}	94,73±0,30 ^{abA}	90,71±0,16 ^{aB}
<i>L. casei</i> LAB 06	8,57±0,27 ^{abA}	8,06±0,31 ^{abcA}	7,58±0,07 ^{aA}	94,08±0,66 ^{abA}	88,53±1,90 ^{aA}
<i>L. casei</i> LAB 07	8,49±0,13 ^{abA}	7,74±0,11 ^{abcB}	7,46±0,09 ^{ab}	91,22±2,70 ^{abA}	87,95±0,23 ^{aA}
<i>L. casei</i> LAB 08	7,89±0,07 ^{bA}	7,36±0,02 ^{cB}	7,02±0,13 ^{aB}	93,22±1,14 ^{abA}	88,90±0,91 ^{aA}
<i>L. casei</i> LAB 09	8,27±0,13 ^{abA}	7,90±0,43 ^{abcA}	7,45±0,39 ^{aA}	95,48±3,73 ^{abA}	90,20±6,19 ^{aA}
<i>L. casei</i> LAB 10	8,32±0,29 ^{abA}	7,45±0,31 ^{cA}	7,37±0,28 ^{aA}	89,72±6,84 ^{abA}	88,76±6,39 ^{aA}

Resultados expressos em média ± desvio padrão. ^{a-b} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as cepas na mesma etapa de digestão ($p < 0,05$). ^{A-C} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as etapas da digestão para a mesma cepa bacteriana ($p < 0,05$). ^{a-b} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as cepas na taxa de sobrevivência do estômago ou intestino ($p < 0,05$). ^{A-B} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas da taxa de sobrevivência no estômago e intestino para a mesma cepa bacteriana ($p < 0,05$).

3.2.2 Teste de Auto-Agregação

A capacidade de auto-agregação das bactérias com potencial probiótico é um dos pré-requisitos para considerá-la um novo probiótico. A capacidade de uma cepa se auto agregar está relacionada a habilidade da mesma em colonizar o trato gastrointestinal humano, além de atuar frente aos patógenos (Yungareva; Urshev, 2018). Entre as BAL apresentadas na Tabela 5, apenas a cepa *L. casei* LAB 08 não apresentou variação ($p > 0,05$) entre os tempos de auto-agregação. Todas as demais apresentaram maiores concentrações em 24 horas de análise, como previamente descrito por Yasmin et al. (2020), sem variação entre os tempos iniciais de 3 e 6 horas. De forma geral, todos os isolados apresentaram elevados resultados de auto-agregação, com destaque para as cepas de *L. brevis* LAB 05 e *L. casei* LAB 08, que apresentaram os maiores resultados (Tabela 5). Os dados encontrados corroboram com pesquisas já realizadas para as mesmas espécies de BAL isoladas de queijos artesanais (Ait Chait et al., 2021; García-Cayuela et al., 2014). Os principais fatores que influenciam a capacidade de auto-agregação das bactérias podem ser a carga e a composição da superfície celular, que pode apresentar compostos da autólise das células, como polissacarídeos e DNA extracelular, além da presença de genes promotores de agregação (García-Cayuela et al., 2014; Nwoko & Okeke, 2021). O trabalho de García-Cayuela et al. (2014) destaca que as cepas de BAL analisadas que apresentaram auto-agregação superior a 50% também exibiram o fenótipo de auto-agregação. Além disso as BAL analisadas apresentaram maiores porcentagens de auto-agregação que cepas de patógenos após 24 horas.

3.2.3 Teste de Hidrofobicidade

A análise de hidrofobicidade é realizada a fim de avaliar a hidrofobicidade das superfícies celulares bacterianas, principalmente em cepas potencialmente probióticas, sendo associada a capacidade de adesão do probiótico ao intestino (Margalho et al., 2021). Diferentes componentes da superfície celular, como proteínas, polissacarídeos, ácidos lipoteicóicos e compostos secretados, estão envolvidos na capacidade de agregação e fixação das células bacterianas no hospedeiro (Nwoko & Okeke, 2021). A Tabela 5 apresenta os resultados de hidrofobicidade da superfície celular das bactérias potencialmente probióticas. De modo geral, os resultados de hidrofobicidade encontrados foram elevados, sendo as cepas de *L. brevis* LAB 05 e *L. casei* LAB 07 as mais hidrofóbicas. *L. plantarum* LAB 01, LAB 02, LAB 03

apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre as porcentagens de hidrofobicidade, com valores abaixo de 90% e *P. acidilactici* LAB 04 obteve a menor porcentagem, abaixo de 50%. Das cepas de *L. casei* isoladas, três cepas (LAB 06, LAB 07 e LAB 10) apresentaram resultado semelhante, com valores de hidrofobicidade superiores a 90%. Estas cepas apresentaram variações nos seus resultados de hidrofobicidade de forma semelhante aos isolados de *L. casei* e *L. plantarum* presentes no trabalho de Tuo et al. (2013) e *L. brevis* na pesquisa de Ait Chait et al. (2021). Barzegar et al. (2021) e Guan et al. (2020) relacionam resultados elevados de hidrofobicidade com a especificidade da parede celular de cada cepa, de modo que a sua composição pode apresentar proteínas intercaladas, aminoácidos hidrofóbicos, lipídeos e outros fatores como a fase de multiplicação celular, que alteram a hidrofobicidade da cepa.

Tabela 5. Resultados das análises de auto-agregação e hidrofobicidade de bactérias potencialmente probióticas isoladas do Queijo Colonial Artesanal (QCA).

Cepas	Auto-agregação (%)			Hidrofobicidade (%)
	3h	6h	24h	
<i>L. plantarum</i> LAB 01	31,62 ± 4,24 ^{aB}	38,96 ± 6,21 ^{aB}	73,56 ± 6,24 ^{aA}	76,69 ± 4,68 ^d
<i>L. plantarum</i> LAB 02	33,08 ± 1,36 ^{aB}	42,80 ± 0,66 ^{aB}	62,72 ± 4,57 ^{aA}	87,41 ± 3,98 ^b
<i>L. plantarum</i> LAB 03	32,47 ± 2,94 ^{aB}	37,76 ± 5,06 ^{aB}	73,18 ± 6,55 ^{aA}	56,06 ± 2,25 ^c
<i>P. acidilactici</i> LAB 04	30,64 ± 3,17 ^{aB}	32,44 ± 6,85 ^{aB}	74,33 ± 3,49 ^{aA}	45,70 ± 4,40 ^f
<i>L. brevis</i> LAB 05	29,43 ± 0,18 ^{aB}	42,96 ± 2,44 ^{aB}	78,44 ± 8,73 ^{aA}	99,67 ± 0,09 ^a
<i>L. casei</i> LAB 06	23,53 ± 0,98 ^{aB}	28,41 ± 1,03 ^{aB}	68,84 ± 8,83 ^{aA}	95,38 ± 0,61 ^{ab}
<i>L. casei</i> LAB 07	22,08 ± 5,14 ^{aB}	39,68 ± 0,45 ^{aAB}	65,69 ± 11,15 ^{aA}	99,72 ± 0,20 ^a
<i>L. casei</i> LAB 08	30,72 ± 11,21 ^{aA}	34,10 ± 16,00 ^{aA}	78,76 ± 4,12 ^{aA}	78,66 ± 0,63 ^{cd}
<i>L. casei</i> LAB 09	36,94 ± 0,29 ^{aB}	35,83 ± 3,37 ^{aB}	77,82 ± 3,09 ^{aA}	53,37 ± 0,87 ^{ef}
<i>L. casei</i> LAB 10	20,29 ± 7,38 ^{aB}	27,50 ± 6,66 ^{aB}	75,04 ± 6,82 ^{aA}	93,16 ± 0,74 ^{ab}

Resultados expressos em média ± desvio padrão. ^{a-b} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as cepas no mesmo horário de avaliação de auto-agregação ($p < 0,05$). ^{A-C} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tempos de auto-agregação para a mesma cepa bacteriana ($p < 0,05$). ^{a-b} Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as cepas nos resultados de hidrofobicidade ($p < 0,05$).

3.3 ENSAIOS DE SEGURANÇA

3.3.1 Atividade Hemolítica e Produção de Gelatinase

A atividade hemolítica, a qual representa um fator de virulência relacionado a invasão de patógenos no hospedeiro, deve ser ausente em bactérias probióticas para garantir a sua segurança, sendo estas classificadas comumente como γ -hemolíticas (Lee et al., 2021). Os resultados de atividade hemolítica estão apresentados na Tabela 6. Nenhuma das cepas de BAL isoladas apresentou atividade hemolítica quando cultivadas em ágar, sendo então classificadas como cepas γ -hemolíticas. Essa classificação condiz com trabalhos prévios que indicam que a maioria das espécies de BAL não apresentam atividade hemolítica (Barzegar et al., 2021; Casarotti et al., 2017; Castro-López et al., 2023; Todorov et al., 2021).

A gelatinase é uma metaloendopeptidase extracelular dependente de zinco, considerada um fator de virulência pois provoca a degradação dos tecidos, como colágeno, fibrina e elastina, facilitando a invasão de patógenos. Este fator de virulência está ligado a presença do gene *gelE*, mas a sua expressão só ocorre quando o gene é ativado por mecanismos específicos de transcrição (Colautti et al., 2022). A Tabela 6 apresenta os resultados de gelatinase, mostrando que nenhuma cepa degradou a gelatina presente no teste, concordando com dados encontrados na literatura (Colombo et al., 2020; Todorov et al., 2021).

3.3.2 Capacidade de Degradação da Mucina

A mucina é uma barreira física presente no epitélio intestinal do hospedeiro, podendo ser degradada por diversas bactérias comensais e patogênicas. É considerada a primeira linha de defesa contra a infiltração dos patógenos e compostos tóxicos (Herath et al., 2020). Algumas espécies de *Bifidobacterium* por exemplo, podem degradar a mucina para utilizá-la como fonte de energia, mas não são capazes de desintegrar a sua barreira funcional (Tanaka et al., 2023). As cepas de BAL analisadas não apresentaram a produção da enzima mucinase (Tabela 6), não apresentando a formação de halos e consequente degradação da mucina, tanto em ágar suplementado com 0,5% de mucina, quanto em ágar suplementado com 0,5% de mucina e 3% de glicose. Os resultados corroboram com outras pesquisas realizadas para as mesmas cepas bacterianas, apresentando resultados negativos para a expressão de mucinase (Casarotti et al.,

2017; Castro-López et al., 2023; Leska et al., 2023). Essa limitação na capacidade de degradação de mucina indica que as bactérias podem não expressar os genes mucina-degradantes, como *engBF* e *afcA*, necessários para o metabolismo dos nutrientes presentes na mesma (Alemão et al., 2021; Castro-López et al., 2023).

Tabela 6. Avaliação da produção de hemolisina, gelatinase, mucinase e lipase por bactérias potencialmente probióticas isoladas de Queijo Colonial Artesanal (QCA).

Cepa	Enzimas			
	Hemolisina	Gelatinase	Mucinase	Lipase
<i>L. plantarum</i> LAB 01	γ-hemólise	Negativo	Negativo	Positivo
<i>L. plantarum</i> LAB 02	γ-hemólise	Negativo	Negativo	Negativo
<i>L. plantarum</i> LAB 03	γ-hemólise	Negativo	Negativo	Negativo
<i>P. acidilactici</i> LAB 04	γ-hemólise	Negativo	Negativo	Negativo
<i>L. brevis</i> LAB 05	γ-hemólise	Negativo	Negativo	Negativo
<i>L. casei</i> LAB 06	γ-hemólise	Negativo	Negativo	Negativo
<i>L. casei</i> LAB 07	γ-hemólise	Negativo	Negativo	Positivo
<i>L. casei</i> LAB 08	γ-hemólise	Negativo	Negativo	Negativo
<i>L. casei</i> LAB 09	γ-hemólise	Negativo	Negativo	Negativo
<i>L. casei</i> LAB 10	γ-hemólise	Negativo	Negativo	Negativo
Controle +	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>

3.3.3 Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos

Há relatos da presença de genes de resistência a antimicrobianos em diversas espécies de microrganismos probióticos, tanto de forma intrínseca, não transferindo os genes e podendo sobreviver durante alguns tratamentos medicamentosos, auxiliando na regulação intestinal e demais ações dos probióticos, quanto adquirida, a qual recebeu este gene de resistência por meio de transferência horizontal (Das et al., 2020). A suscetibilidade das cepas isoladas de bactérias ácido lácticas contra 7 antibióticos, de uso comum e hospitalar, está apresentada na Tabela 7. Todos os antibióticos apresentaram pelo menos uma cepa resistente, mas todas elas foram sensíveis a pelo menos duas classes de antibióticos diferentes, como exigido pela legislação brasileira (Brasil, 2021). Castro-López et al. (2023) cita que a resistência a antimicrobianos dependem da espécie, e algumas vezes pode ter variação entre cepas da mesma espécie. O documento do EFSA (2012) não apresentou valor de corte para bactérias da espécie *L. plantarum* frente a estreptomicina, portanto foi utilizado o valor de corte informado pela

EUC (2003), de modo que dos 3 isolados, as cepas *L. plantarum* LAB 02 e LAB 03 foram resistentes. A resistência de *L. plantarum* a estreptomicina, é considerada intrínseca, pois a absorção deste antibiótico está ligada ao transporte de elétrons mediado pelo citocromo, sistema ausente em *Lactobacillaceae*, sendo então incapaz de ser absorvido pelas mesmas (Colautti et al., 2022). O trabalho de Anisimova; Yarullina (2019) identificou resistência em 12 cepas de *L. plantarum* frente a estreptomicina, detectando a presença dos genes de resistência a estreptomicina *aad A* e *aad E*. Assim como neste trabalho, os resultados de CIM variaram no trabalho de Shao et al. (2015), com valores entre 16 e 512 µg/mL, sendo considerados resistentes segundo o ponto de corte informado pela EUC (2003). Todas as demais cepas estudadas se mostraram sensíveis a sua ação.

Li et al. (2020) cita que muitas espécies da família *Lactobacillaceae* apresentam resistência a antibióticos com ação na inibição da síntese de ácidos nucleicos e na inibição da síntese de parede celular, como é o caso do metronidazol, benzilpenicilina e cefalexina. Todas as 10 cepas de BAL mostraram resistência frente a estes antimicrobianos, apenas a cepa *L. casei* LAB 08 se apresentou sensível a benzilpenicilina. No entanto, apenas *L. plantarum* LAB 03 e *L. casei* LAB 08 apresentaram resistência a ampicilina, também com ação na inibição da síntese da parede celular. Essa resistência pode ter sido desenvolvida devido a uma pressão de seleção, no meio de isolamento das mesmas, podendo apresentar genes de resistência transferíveis, como na transferência pela expressão de betalactamases de amplo espectro, a partir dos genes *blaZ* e *blaSHV* (Colautti et al., 2022; Li et al., 2020). Na classe dos carbapenêmicos, dois isolados de *L. casei* (LAB 07 e LAB 10) apresentaram resistência ao meropenem. DeMarco et al. (2023) encontrou *Lactobacillaceae* resistentes a meropenem em paciente imunocomprometido que fazia a ingestão de probióticos e, entre as cepas isoladas, foi detectada a presença de *L. casei*. Anisimova et al. (2022) encontrou cepas de *Lacticaseibacillus paracasei* resistentes a meropenem oriundas de suplementos probióticos. A pesquisa de Duche et al. (2023) não identificou resistência de bactérias probióticas frente ao imipenem, outro antibiótico da classe dos carbapenêmicos, mas apresentando resistência ao meropenem por parte de isolados de *L. brevis*, *L. paracasei*, *Lactiplantibacillus pentosus* e *L. casei*. Os autores citam que a resistência aos carbapenêmicos por parte da família *Lactobacillaceae* pode ser espécie-específica, corroborando com esta pesquisa. No entanto, pesquisas que utilizaram meropenem frente a microrganismos probióticos são escassas, não sendo encontradas informações a respeito da sua resistência. Acredita-se que o meropenem apresenta uma resistência intrínseca, devido a fazer parte de β -lactâmicos, com ação na inibição da parede celular. *Lactobacillaceae* são geralmente sensíveis a antimicrobianos que atuam na inibição da síntese de proteínas, como a clindamicina

(Ammor et al., 2007). A única cepa que apresentou resistência a clindamicina foi *L. brevis* LAB 05. O trabalho realizado por Silva (2016) sobre bactérias ácido lácticas com propriedades probióticas isoladas de queijo Minas artesanal, encontrou cepas de *L. casei* e *L. plantarum* sensíveis a clindamicina. No entanto, também encontrou cepas resistentes de *L. brevis*.

Os dados de CBM apresentaram ausência de ação bactericida nos antibióticos que apresentaram 100% de resistência (cefalexina e metronidazol), nas concentrações estudadas. A benzilpenicilina, que apresentou resistência na grande maioria dos isolados, apresentou CBM próxima ao limite máximo avaliado. Alguns antibióticos apresentaram concentrações iguais de CIM e CBM. No entanto, outros não apresentaram concentrações de CBM na faixa de estudo, mesmo apresentando sensibilidade na cepa avaliada.

Tabela 7. Resultados de CIM e CBM para bactérias ácido lácticas isoladas de Queijo Colonial Artesanal (QCA).

Cepas	Antibióticos (µg/mL)													
	Ampicilina		Benzilpenicilina		Estreptomicina		Clindamicina		Cefalexina		Metronidazol		Meropenem	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>L. plantarum</i> LAB 01	2	4	4	-	4	64	0,25	0,25	-	-	-	-	0,125	0,125
<i>L. plantarum</i> LAB 02	0,25	4	16	64	16	-	2	16	64	-	-	-	1	2
<i>L. plantarum</i> LAB 03	4	8	1	1	32	64	0,125	0,125	32	-	-	-	0,25	4
<i>P. acidilactici</i> LAB 04	4	-	4	64	64	-	0,5	4	-	-	-	-	2	16
<i>L. brevis</i> LAB 05	0,5	2	8	32	64	256	2	16	64	-	-	-	2	4
<i>L. casei</i> LAB 06	0,5	8	1	32	2	64	0,25	2	-	-	-	-	2	-
<i>L. casei</i> LAB 07	1	8	1	4	16	128	0,25	1	-	-	-	-	4	64
<i>L. casei</i> LAB 08	8	16	0,25	32	32	32	0,5	2	-	-	-	-	0,5	-
<i>L. casei</i> LAB 09	2	32	1	2	32	512	0,125	0,5	32	-	-	-	0,25	2
<i>L. casei</i> LAB 10	4	4	1	32	64	64	0,5	2	-	-	-	-	8	64
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	4	-	4	64	128	-	0,25	4	-	-	-	-	2	-
<i>L. casei</i> BGP 93	4	-	4	-	128	1024	0,25	4	-	-	-	-	2	-
Ponto de Corte														
<i>L. plantarum</i>	2		0,5		16*		2		16		4		2	
<i>L. casei</i>	4		0,5		64		1		16		4		2	
<i>L. brevis</i> **	2		0,5		64		1		16		4		2	
<i>P. acidilactici</i>	4		0,5		64		1		16		4		2	

CIM – Concentração inibitória mínima. CBM – Concentração bactericida mínima. (*) – Concentração ≥ 16 µg/mL foram consideradas resistentes (EUC, 2002). (**) - Obrigatoriamente heterofermentativo. Pontos de corte adaptados de EUC (2003); EFSA (2012); EUCAST (2021); Gad et al. (2014), conforme Tabela 2.

3.4 ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE LIPASE PARA AVALIAÇÃO DE POTENCIAL TECNOLÓGICO

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis, com formação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis e monoacilgliceróis, com aplicação na indústria de alimentos, química e na gestão ambiental (Esteban-Torres et al., 2015; Konkit; Kim, 2016). A principal aplicação de BAL com ação lipolítica na indústria de alimentos seria na indústria láctea, devido a formação de compostos de aroma e sabor durante a maturação dos queijos (Montazeri; Yasaei; Kazemi, 2015). A Tabela 6 apresenta os resultados de ação de lipases em ágar enriquecido. Duas cepas de espécies diferentes apresentaram ação lipolítica, *L. casei* LAB 07 e *L. plantarum* LAB 01. Estas espécies já apresentaram ação lipolítica em outros estudos com isolados de queijos, como nos trabalhos de Oǵdak et al. (2020) e Guan et al. (2020). As demais cepas isoladas destas espécies e os isolados de *L. brevis* e *P. acidilactici* apresentaram resultados negativos. Uma alternativa para favorecer a ação lipolítica destas cepas é realizar a liberação e purificação das lipases presentes, como no trabalho de Esteban-Torres et al. (2015). Os autores realizaram a adição de um gene codificador de lipase em uma cepa de *L. plantarum*, induziram a expressão da enzima e a caracterizaram, obtendo uma lipase halotolerante e com boa atividade em pH ácido, sendo atrativas a uma aplicação em alimentos fermentados.

4. CONCLUSÃO

Todas as cepas isoladas foram identificadas como espécies que apresentam histórico de uso por suas propriedades probióticas. Apresentaram alta sobrevivência pelo sistema gastrointestinal, alcançando o intestino com contagens elevadas de células, além de altas porcentagens de auto-agregação e hidrofobicidade. Também apresentaram conformidade em relação aos requisitos de segurança, não mostrando produção de enzimas consideradas fatores de virulência e com sensibilidade a, no mínimo, duas classes diferentes de antimicrobianos. Dois isolados também apresentaram atividade lipolítica, com potencial uso tecnológico. A partir destes resultados, pode-se concluir que todos os isolados apresentam potencial probiótico.

REFERÊNCIAS

- AIT CHAIT, Y.; GUNENC, A.; HOSSEINIAN, F.; BENDALI, F. Antipathogenic and probiotic potential of *Lactobacillus brevis* strains newly isolated from Algerian artisanal cheeses. **Folia Microbiologica**, vol. 66, nº 3, p. 429–440, 11 jun. 2021. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00857-1>
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, vol. 215, nº 3, p. 403–410, out. 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- ANDREWS, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acesso em: 02 fev. 2024.
- ALEMAO, C. A.; BUDDEN, K. F.; GOMEZ, H. M.; REHMAN, S. F.; MARSHALL, J. E.; SHUKLA, S. D.; DONOVAN, C.; FORSTER, S. C.; YANG, I. A.; KEELY, S.; MANN, E. R.; EL OMAR, E. M.; BELZ, G. T.; HANSBRO, P. M. Impact of diet and the bacterial microbiome on the mucous barrier and immune disorders. **Allergy**, vol. 76, nº 3, p. 714–734, 23 mar. 2021. <https://doi.org/10.1111/all.14548>
- AMMOR, M. S.; BELÉN FLÓREZ, A.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, vol. 24, nº 6, p. 559–570, set. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.11.001>
- ANISIMOVA, E. A.; YARULLINA, D. R. Antibiotic Resistance of *LACTOBACILLUS* Strains. **Current Microbiology**, vol. 76, nº 12, p. 1407–1416, 25 dez. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01769-7>
- ANISIMOVA, E.; GOROKHOVA, I.; KARIMULLINA, G.; YARULLINA, D. Alarming Antibiotic Resistance of *Lactobacilli* Isolated from Probiotic Preparations and Dietary Supplements. **Antibiotics**, vol. 11, nº 11, p. 1557, 5 nov. 2022. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111557>
- ARGYRI, A. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K.-A. G.; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G.-J. E.; PANAGOU, E. Z.; TASSOU, C. C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 282–291, abr. 2013. doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005
- BARACHE, N.; LADJOUZI, R.; BELGUESMIA, Y.; BENDALI, F.; DRIDER, D. Abundance of *Lactobacillus plantarum* Strains with Beneficial Attributes in Blackberries (*Rubus* sp.), Fresh Figs (*Ficus carica*), and Prickly Pears (*Opuntia ficus-indica*) Grown and Harvested in Algeria. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, vol. 12, nº 4, p. 1514–1523, 24 dez. 2020. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09632-z>
- BARBOSA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**, vol. 21, nº 5, p. 651–656, maio 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.002>

BARZEGAR, H.; ALIZADEH BEHBAHANI, B.; FALAH, F. Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk cheeses. **Food Science & Nutrition**, vol. 9, nº 8, p. 4094–4107, 14 ago. 2021. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2365>

BRASIL. Guia de Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos. **Guia nº 21/2021** – versão 2, de 05/05/2021. Publicado em: 06 mai. 2021. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/guias#/visualizar/448269>. Acesso em: 01 fev. 2024.

BRODKORB, A.; EGGER, L.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; ASSUNÇÃO, R.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU-LACANAL, C.; BOUTROU, R.; CARRIÈRE, F.; CLEMENTE, A.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EDWARDS, C.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; ... RECIO, I. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols** 2019 14:4, vol. 14, nº 4, p. 991–1014, 18 mar. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

CAMELO-SILVA, C.; BARROS, E. L. S.; VERRUCK, S.; MARAN, B. M.; CANELLA, M. H. M.; ESMERINO, E. A.; SILVA, R.; PRUDENCIO, E. S. How ice cream manufactured with concentrated milk serves as a protective probiotic carrier? An *in vitro* gastrointestinal assay. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e28621, 28 jun. 2022. <https://doi.org/10.1590/FST.28621>

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, vol. 6, nº 8, p. 1621–1624, 8 ago. 2012. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>

CASAROTTI, S. N.; CARNEIRO, B. M.; TODOROV, S. D.; NERO, L. A.; RAHAL, P.; PENNA, A. L. B. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, vol. 67, nº 4, p. 289–301, 28 abr. 2017. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1258-2>

CASTRO-LÓPEZ, C.; GARCÍA-GALAZ, A.; GARCÍA, H. S.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CORDOBA, B.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Potential probiotic lactobacilli strains isolated from artisanal Mexican Cocido cheese: evidence-based biosafety and probiotic action-related traits on in vitro tests. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 54, nº 3, p. 2137–2152, 14 set. 2023. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01059-2>

CELIK TAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, T.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553–559, jan. 2007. doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.011

CHEN, S.; CAO, Y.; FERGUSON, L. R.; SHU, Q.; GARG, S. Flow cytometric assessment of the protectants for enhanced in vitro survival of probiotic lactic acid bacteria through

simulated human gastro-intestinal stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 95, n° 2, p. 345–356, 4 jul. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4030-3>

COCK, P. J. A.; ANTAO, T.; CHANG, J. T.; CHAPMAN, B. A.; COX, C. J.; DALKE, A.; FRIEDBERG, I.; HAMELRYCK, T.; KAUFF, F.; WILCZYNSKI, B.; DE HOON, M. J. L. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, vol. 25, n° 11, p. 1422–1423, 1 jun. 2009. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>

COLAUTTI, A.; ARNOLDI, M.; COMI, G.; IACUMIN, L. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. **Food Microbiology**, vol. 103, p. 103934, 1 maio 2022. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2021.103934>

COLOMBO, M.; NERO, L. A.; TODOROV, S. D. Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 51, n° 2, p. 787–795, 22 jun. 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00227-y>

DAS, D. J.; SHANKAR, A.; JOHNSON, J. B.; THOMAS, S. Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. **Nutrition**, vol. 69, p. 110567, jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110567>

DEGENHARDT, R.; CARVALHO, M. M.; VOIDALESKI, M. F.; DAROS, G. F.; GUARAGNI, A.; DE MELO PEREIRA, G. V.; DE DEA LINDNER, J. Brazilian artisanal Colonial cheese: characterization, microbiological safety, and survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis during ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 54, n° 3, p. 2129–2135, 23 set. 2023. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01022-1>

DEMARCO, E.; DEPETRILLO, J.; QADEER, F. Meropenem resistant *Lactobacillus* endocarditis in an immunocompetent patient. **SAGE Open Medical Case Reports**, vol. 11, p. 2050313X2311527, 28 jan. 2023. <https://doi.org/10.1177/2050313X231152709>

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 72, n° 7, p. 5069–5072, jul. 2006. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>

DUCHE, R. T.; SINGH, A.; WANDHARE, A. G.; SANGWAN, V.; SIHAG, M. K.; NWAGU, T. N. T.; PANWAR, H.; EZEUGU, Lewis. I. Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. **BMC Microbiology**, vol. 23, n° 1, p. 142, 19 maio 2023. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02883-0>

EFSA. European Food Safety Authority. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, vol. 10, no. 6, Jun. 2012. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>.

EUC. European Commission. **Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance**. Revised on 24 January 2003.

ESTEBAN-TORRES, M.; MANCHENO, J. M.; DE LAS RIVAS, B.; MUÑOZ, R. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 60, n° 1, p. 246–252, jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.063>

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Versão 11.0, 2021.

FARID, W.; MASUD, T.; SOHAIL, A.; AHMAD, N.; NAQVI, S. M. S.; KHAN, S.; ALI, A.; KHALIFA, S. A.; HUSSAIN, A.; ALI, S.; SAGHIR, M.; SIDDEEG, A.; MANZOOR, M. F. Gastrointestinal transit tolerance, cell surface hydrophobicity, and functional attributes of *Lactobacillus Acidophilus* strains isolated from Indigenous Dahi. **Food Science & Nutrition**, vol. 9, n° 9, p. 5092–5102, 13 set. 2021. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2468>

GAD, G. F. M.; ABDEL-HAMID, A. M.; FARAG, Z. S. H. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 25–33, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100005>

GARCÍA-CAYUELA, T.; KORANY, A. M.; BUSTOS, I.; P. GÓMEZ DE CADIÑANOS, L.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C.; MARTÍNEZ-CUESTA, M. C. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, vol. 57, p. 44–50, mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.010>

GOMAND, F.; BORGES, F.; BURGAIN, J.; GUERIN, J.; REVOL-JUNELLES, A.-M.; GAIANI, C. Food Matrix Design for Effective Lactic Acid Bacteria Delivery. **Annual Review of Food Science and Technology**, vol. 10, n° 1, p. 285–310, 25 mar. 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121140>

GUAN, C.; TAO, Z.; WANG, L.; ZHAO, R.; CHEN, X.; HUANG, X.; SU, J.; LU, Z.; CHEN, X.; GU, R. Isolation of novel *Lactobacillus* with lipolytic activity from the vinasse and their preliminary potential using as probiotics. **AMB Express**, vol. 10, n° 1, p. 91, 15 dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01026-2>

HERATH, M.; HOSIE, S.; BORNSTEIN, J. C.; FRANKS, A. E.; HILL-YARDIN, E. L. The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 10, 28 maio 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00248>

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, vol. 11, n° 8, p. 506–514, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 20776-1: 2019**. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test

devices – Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Geneva: ISO; 2019. 19 p.

KAMIMURA, B. A.; MAGNANI, M.; LUCIANO, W. A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; PIMENTEL, T. C.; ALVARENGA, V. O.; PELEGRINO, B. O.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 18, nº 5, p. 1636–1657, 1 set. 2019. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12486>

KONKIT, M.; KIM, W. Activities of amylase, proteinase, and lipase enzymes from *Lactococcus chungangensis* and its application in dairy products. **Journal of Dairy Science**, vol. 99, nº 7, p. 4999–5007, jul. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11002>

LAKHLIFI, T.; EL OIRDI, S.; MAROUI, I.; ZOUHAIR, R.; BELHAJ, A. Probiotic properties and safety aspect of three antifungal lactic acid bacteria strains isolated from wheat and camel milk. **Biologia**, vol. 78, nº 4, p. 1129–1139, 18 jan. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01319-4>

LEE, B. S.; BAN, O.-H.; BANG, W. Y.; CHAE, S. A.; OH, S.; PARK, C.; LEE, M.; KIM, S.-J.; YANG, J.; JUNG, Y. H. Safety assessment of *Lactobacillus reuteri* IDCC 3701 based on phenotypic and genomic analysis. **Annals of Microbiology**, vol. 71, nº 1, p. 10, 15 dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13213-021-01622-y>

LESKA, A.; NOWAK, A.; ROSICKA-KACZMAREK, J.; RYNGAJŁŁO, M.; CZARNECKA-CHREBELSKA, K. H. Characterization and Protective Properties of Lactic Acid Bacteria Intended to Be Used in Probiotic Preparation for Honeybees (*Apis mellifera* L.)—An In Vitro Study. **Animals**, vol. 13, nº 6, p. 1059, 15 mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/ani13061059>

LI, T.; TENG, D.; MAO, R.; HAO, Y.; WANG, X.; WANG, J. A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. **Food Research International**, vol. 136, p. 109571, out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109571>

LOPES, D. S.; BASTOS, P. A. M. B.; REBELLO, L. P. G. Avanços da aplicação de bactérias ácido lácticas com funções probióticas na produção de fermentados lácticos: uma revisão. **Revista Vértices**, vol. 25, nº 1, 14 fev. 2023. <https://doi.org/10.19180/1809-2667.v25n12023.18217>

MARGALHO, L. P.; FELICIANO, M. D. E.; SILVA, C. E.; ABREU, J. S.; PIRAN, M. V. F.; SANT'ANA, A. S. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, vol. 103, nº 9, p. 7908–7926, 1 set. 2020. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-18194>

MARGALHO, L. P.; JORGE, G. P.; NOLETO, D. A. P.; SILVA, C. E.; ABREU, J. S.; PIRAN, M. V. F.; BROCCHI, M.; SANT'ANA, A. S. Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: From screening to in product approach. **Microbiological Research**, vol. 242, p. 126622, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126622>

MASELLA, A. P.; BARTRAM, A. K.; TRUSZKOWSKI, J. M.; BROWN, D. G.; NEUFELD, J. D. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **BMC Bioinformatics**, vol. 13, nº 1, p. 31, 14 dez. 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-31>

MOHAMMED, S.; ÇON, A. H. Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from traditional cheese. **LWT**, vol. 152, p. 112319, dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112319>

MONTAZERI, V.; YASAEI, G.; KAZEMI, M. J. Isolation, identification, and characterization of lactic acid bacteria isolated from the raw milk of a single-humped camel. **Advanced Research in Microbial Metabolites and Technology**, vol. 3, p. 53-63. 2020. <https://doi.org/10.22104/armmt.2022.5077.1056>

NWOKO, E. Q. A.; OKEKE, I. N. Bacteria autoaggregation: how and why bacteria stick together. **Biochemical Society Transactions**, vol. 49, nº 3, p. 1147–1157, 30 jun. 2021. <https://doi.org/10.1042/BST20200718>

OLDAK, A.; ZIELIŃSKA, D.; ŁEPECKA, A.; DŁUGOSZ, E.; KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, D. Lactobacillus plantarum Strains Isolated from Polish Regional Cheeses Exhibit Anti-Staphylococcal Activity and Selected Probiotic Properties. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, vol. 12, nº 3, p. 1025–1038, 28 set. 2020. DOI 10.1007/s12602-019-09587-w. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12602-019-09587-w>

PAPADIMITRIOU, K.; ZOUMPOPOULOU, G.; FOLIGNA, B.; ALEXANDRAKI, V.; KAZOU, M.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. **Frontiers in Microbiology**, vol. 6, 17 fev. 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058>

PENNA, A. L. B.; GIGANTE, M. L.; TODOROV, S. D. Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. **Foods**, vol. 10, nº 7, p. 1562, 6 jul. 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10071562>

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, vol. 41, nº D1, p. D590–D596, 27 nov. 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

RUIZ-MOYANO, S.; GONÇALVES DOS SANTOS, M. T. P.; GALVÁN, A. I.; MERCHÁN, A. V.; GONZÁLEZ, E.; CÓRDOBA, M. de G.; BENITO, M. J. Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: probiotic characteristics and prebiotic metabolism. **LWT**, vol. 114, p. 108388, nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108388>

SHAO, Y.; ZHANG, W.; GUO, H.; PAN, L.; ZHANG, H.; SUN, T. Comparative studies on antibiotic resistance in Lactobacillus casei and Lactobacillus plantarum. **Food Control**, vol. 50, p. 250–258, abr. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.003>

SILVA, J. G. Identificação molecular de bactérias ácido-láticas e propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo minas artesanal de Araxá, Minas Gerais. 2016.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2016.

SILVA, H. L. A.; BALTHAZAR, C. F.; ESMERINO, E. A.; VIEIRA, A. H.; CAPPATO, L. P.; NETO, R. P. C.; VERRUCK, S.; CAVALCANTI, R. N.; PORTELA, J. B.; ANDRADE, M. M.; MORAES, J.; FRANCO, R. M.; TAVARES, M. I. B.; PRUDENCIO, E. S.; FREITAS, M. Q.; NASCIMENTO, J. S.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; CRUZ, A. G. Effect of sodium reduction and flavor enhancer addition on probiotic Prato cheese processing. **Food Research International**, vol. 99, p. 247–255, set. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.018>

TANAKA, Y.; ARYANTINI, N. P. D.; YAMASAKI, E.; SAITO, M.; TSUKIGASE, Y.; NAKATSUKA, H.; URASHIMA, T.; HORIUCHI, R.; FUKUDA, K. In Vitro Probiotic Characterization and Safety Assessment of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Milk of Japanese-Saanen Goat (*Capra hircus*). **Animals** **2023**, Vol. **13**, Page **7**, vol. 13, nº 1, p. 7, 20 dez. 2023. <https://doi.org/10.3390/ANI13010007>

TODOROV, S. D.; HOLZAPFEL, W. H.; NERO, L. A. Safety evaluation and bacteriocinogenic potential of *Pediococcus acidilactici* strains isolated from artisanal cheeses. **LWT**, vol. 139, p. 110550, mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110550>

TUO, Y.; YU, H.; AI, L.; WU, Z.; GUO, B.; CHEN, W. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. **Journal of Dairy Science**, vol. 96, nº 7, p. 4252–4257, jul. 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>

WANG, Y.; QIAN, P.-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE**, vol. 4, nº 10, p. e7401, 9 out. 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>

YASMIN, I.; SAEED, M.; KHAN, W. A.; KHALIQ, A.; CHUGHTAI, M. F. J.; IQBAL, R.; TEHSEEN, S.; NAZ, S.; LIAQAT, A.; MEHMOOD, T.; AHSAN, S.; TANWEER, S. In Vitro Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Raw Camel Milk. **Microorganisms**, vol. 8, nº 3, p. 354, 2 mar. 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030354>

YUNGAREVA, T.; URSHEV, Z. The aggregation-promoting factor in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*: confirmation of the presence and expression of the *apf* gene and in silico analysis of the corresponding protein. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 34, nº 7, p. 97, 19 jul. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2480-1>

ZHANG, F.; JIANG, M.; WAN, C.; CHEN, X.; CHEN, X.; TAO, X.; SHAH, N. P.; WEI, H. Screening probiotic strains for safety: Evaluation of virulence and antimicrobial susceptibility of enterococci from healthy Chinese infants. **Journal of Dairy Science**, vol. 99, nº 6, p. 4282–4290, jun. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10690>

ZOLDAN, J.; DE MARCO, I.; VERRUCK, S.; GOMIDE, A. I.; CARTABIANO, C. E. L.; DE MELO PEREIRA, G. V.; DE DEA LINDNER, J. Evaluation of viability to simulated gastrointestinal tract passage of probiotic strains and pioneer bioaccessibility analyses of antioxidants in chocolate. **Food Bioscience**, v. 52, p. 102494, 1 abr. 2023. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102494>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo abordou diferentes assuntos relacionados ao queijo colonial artesanal, análises metataxonômicas, alterações bioquímicas durante a maturação do queijo e bactérias ácido lácticas com potencial probiótico. Este trabalho foi a primeira pesquisa realizada avaliando as alterações na maturação e sazonalidade do Queijo Colonial Artesanal, além de ser um dos poucos trabalhos que avaliou a atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas com carbapenêmicos (meropenem).

A avaliação do QCA mostrou uma variada ecologia microbiana, com abundância de *Lactococcus* e leveduras, e variações na composição de ácidos graxos e compostos de aroma e sabor, oriundas da variação sazonal e consequentes alterações da microbiota do ambiente e alimentação animal. O queijo também se mostrou uma boa fonte de cálcio e CLA. As bactérias ácido lácticas isoladas apresentaram potencial probiótico, com morfologia típica e boas características de adesão ao hospedeiro e de segurança.

Como continuação a esta pesquisa sugere-se, para os isolados potencialmente probióticos, a realização de análises genéticas para avaliar a presença de genes e fatores de virulência, como a presença de enzimas descarboxilase formadoras de aminas biogênicas, e a presença de genes de resistência a antimicrobianos com possibilidade de transferência horizontal, além de testes *in vivo* e o depósito do genoma completo em banco de dados públicos. Também se sugere a aplicação das culturas em alimentos, para avaliação das suas potenciais aplicações em diferentes matrizes alimentícias.

