



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS NO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL DO SERIDÓ
POTIGUAR**

RUANA CÉLIA GOMES DE MORAIS COSTA RODRIGUES

MACAÍBA/RN-BRASIL/2025

RUANA CÉLIA GOMES DE MORAIS COSTA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS NO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL DO SERIDÓ
POTIGUAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal (PPGPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel.

MACAÍBA/RN-BRASIL/2025

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Rodolfo Helinski - Escola Agrícola de Jundiaí -
EAJ - Macaíba

Rodrigues, Ruana Célia Gomes de Moraes Costa.

Caracterização molecular de bactérias ácido lácticas no queijo de coalho artesanal do Seridó potiguar / Ruana Célia Gomes de Moraes Costa Rodrigues. - 2025.

67f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Macaíba, RN, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel.

1. Queijo artesanal - Dissertação. 2. Diversidade genética - Dissertação. 3. Sequenciamento 16sRNA - Dissertação. 4. Leite cru - Dissertação. 5. Microbiota láctea- Dissertação. 6. Análise metagenômica - Dissertação. I. Rangel, Adriano Henrique do Nascimento. II. Título.

RN/UF/BSPRH

CDU 637.3

Elaborado por Elaine Paiva de Assunção - CRB-15/492

RUANA CÉLIA GOMES DE MORAIS COSTA RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal (PPGPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

APROVADA EM ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel (UFRN)
Orientador

Dra. Emmanuella de Oliveira Moura Araújo
Membro Externo ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal

Dra. Katya Anaya Jacinto Scattone
Membro Externo ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal

“A ele orarás, e ele te ouvirá, e pagarás os teus votos”

Jó 22:27

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sustentou cada passo desta caminhada. Em meio às incertezas, angústias e noites silenciosas, sua presença foi constante. Obrigada, Senhor, por renovar minha fé nos momentos em que as forças me faltaram, e por me lembrar que nenhum sonho é impossível quando se confia em Ti.

Aos meus pais, Ana e Romério, alicerces da minha vida. Vocês me ensinaram a sonhar alto. São exemplos de coragem, amor e dedicação. Obrigada por me ensinarem, desde cedo, o valor do esforço, da honestidade e da educação. Tudo o que conquistei até aqui tem raízes no amor e na confiança que vocês depositaram em mim. Obrigada por todo o amor, por cada gesto de renúncia e por nunca deixarem de acreditar em mim, mesmo quando eu mesma duvidava. Essa conquista também é de vocês.

Ao meu esposo Homero, meu porto seguro. Obrigada por caminhar comigo mesmo nos momentos mais difíceis, por segurar minha mão quando tremia e por ser abrigo em meio ao caos. O teu amor foi o meu descanso.

Ao meu filho Romeo, meu milagre, minha luz, meu motivo. Foi por você que eu segui em frente com mais coragem. Te amo com uma intensidade que nenhuma palavra pode alcançar. Que um dia você leia essas linhas e saiba que a mamãe venceu por você.

À minha irmã Raiany, minha eterna confidente, com quem compartilho não apenas o sangue, mas a alma. Obrigada por ser presença constante, por cada palavra de incentivo e por me emprestar forças quando as minhas se esgotavam.

Aos meus sobrinhos Samuel e Paulo, que com sua inocência e alegria tornaram meus dias mais leves e felizes. Ao meu cunhado José Roberto e aos demais familiares e amigos, que acompanharam de perto essa trajetória e me acolheram com palavras de incentivo, orações e carinho. Cada gesto, por menor que tenha parecido, teve enorme importância para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Rangel, minha profunda gratidão pela escuta generosa, orientação ética e sensível, e por acreditar neste trabalho mesmo diante dos desafios. Obrigada por conduzir esta jornada com seriedade, acolhimento e respeito à minha trajetória.

Às minhas coorientadoras, Dr^a Danielle Sales e Dr^a Emmanuella Moura, obrigada por cada ensinamento, por cada olhar atento e por contribuírem com excelência e humanidade para a formação que hoje celebro. Vocês foram inspiração e força neste caminho. Ao colega Gustavo Felipe Correia Sales, agradeço de forma especial pelo apoio e dedicação nas análises, cuja contribuição foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao SEBRAE, por meio de toda sua equipe, agradeço imensamente pelo apoio institucional, pelo incentivo à pesquisa e pela valorização da produção artesanal. De modo especial, agradeço à Kessiany Souza, pela disponibilidade, articulação e confiança no desenvolvimento deste estudo. Aos produtores de queijo que gentilmente cederam as amostras, meu reconhecimento e gratidão: sem sua colaboração, esta pesquisa não teria sido possível.

Finalizo com o coração cheio. Este mestrado é uma vitória construída com esforço, fé, amor e apoio coletivo. Que este trabalho represente não apenas uma conquista acadêmica, mas também um testemunho de gratidão, superação e propósito.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL NO SERIDÓ POTIGUAR

Rodrigues, Ruana C. G. de Moraes. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL NO SERIDÓ POTIGUAR. 2025. 67f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal: Tecnologia e Avaliação da Qualidade de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Macaíba –RN, 2025.

RESUMO: O queijo de coalho artesanal tem grande relevância sociocultural e econômica no Nordeste, sobretudo no Seridó Potiguar. Produzido com leite cru e fermentação espontânea, desenvolve microbiota autóctone responsável por atributos sensoriais e funcionais singulares. Este estudo caracterizou molecularmente a microbiota de 32 amostras pelo sequenciamento da região V3–V4 do gene 16S rRNA, identificando 69 espécies em 25 gêneros. Predominaram bactérias do filo *Firmicutes*, com destaque para o gênero *Enterococcus*, que representou cerca de 25% da comunidade microbiana. Esse grupo apresenta elevado potencial tecnológico, pela produção de bacteriocinas, contribuição para a acidificação, modulação da textura e intensificação do aroma, além de reforçar a estabilidade e a segurança do produto. Outros gêneros de BAL, como *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, também atuaram na geração de compostos aromáticos e na síntese de exopolissacarídeos, fundamentais para a qualidade sensorial e a inibição de microrganismos indesejáveis. A diversidade encontrada confirma o terroir microbiológico do queijo do Seridó e evidencia a microbiota como recurso estratégico para valorização, inovação e expansão mercadológica do produto.

PALAVRAS-CHAVE: Análise metagenômica; diversidade genética; leite cru; microbiota láctea; queijo artesanal; sequenciamento 16S rRNA.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM ARTISANAL COALHO CHEESE IN THE SERIDÓ POTIGUAR REGION

Rodrigues, Ruana C. G. de Moraes. *Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria from Artisanal Coalho Cheese in the Seridó Potiguar*. 2025. 67f. Master's Dissertation (Master in Animal Production: Technology and Quality Assessment of Products of Animal Origin) – Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Macaíba – RN, 2025.

ABSTRACT: Artisanal coalho cheese holds great sociocultural and economic relevance in Northeastern Brazil, especially in the Seridó Potiguar region. Produced with raw milk and spontaneous fermentation, it develops an autochthonous microbiota responsible for unique sensory and functional attributes. This study molecularly characterized the microbiota of 32 samples through sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene, identifying 69 species across 25 genera. Bacteria from the phylum *Firmicutes* predominated, with emphasis on the genus *Enterococcus*, which accounted for about 25% of the microbial community. This group presents high technological potential due to its ability to produce bacteriocins, contribute to acidification, modulate texture, and enhance aroma, in addition to reinforcing product stability and safety. Other LAB genera, such as *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Streptococcus*, also contributed to the production of aromatic compounds and the synthesis of exopolysaccharides, which are essential for sensory quality and the inhibition of undesirable microorganisms. The observed diversity confirms the microbial terroir of Seridó cheese and highlights the microbiota as a strategic resource for valorization, innovation, and market expansion of the product.

KEYWORDS: Metagenomic analysis; genetic diversity; raw milk; dairy microbiota; artisanal cheese; 16S rRNA sequencing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma da produção artesanal de queijo de coalho, com base em práticas adotadas por produtores familiares no semiárido nordestino. Fonte: Elaboração própria, adaptada de dados de campo e literatura científica (2025) 17
- Figura 2.** Mapa do estado do Rio Grande do Norte, Brasil, destacando os municípios da região do Seridó onde foram obtidas as amostras 37
- Figura 3.** Fluxo metodológico do sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA bacteriano, incluindo extração de DNA, amplificação e análise bioinformática. Protocolo desenvolvido pela Neoprospecta Microbiome Technologies. Fonte: Elaborado pela autora.....41
- Figura 4.** Distribuição taxonômica das sequências identificadas em amostras de queijo de coalho artesanal da região do Seridó, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil..... 48
- Figura 5.** Abundância relativa (%) dos gêneros bacterianos detectados em queijo de coalho artesanal da região do Seridó, estado do Rio Grande do Norte, Brasil.....49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características físico-químicas típicas do queijo de coalho artesanal, conforme relatado na literatura. Os valores refletem faixas comumente encontradas em queijos produzidos artesanalmente no Nordeste brasileiro, incluindo parâmetros de acidez (pH e acidez titulável), composição centesimal (umidade, proteínas, gordura, sólidos totais e sólidos não-gordurosos), minerais (cálcio e sódio), textura e perfil sensorial.....18
- Tabela 2.** Sequências de *primers* usadas em ensaios para Amplificação da Região V3–V4 do Gene 16S rRNA para identificação genômica de bactérias ácido lácticas em queijo.....40
- Tabela 3.** Médias dos parâmetros físico-químicos dos queijos de coalho artesanais analisados.....42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Região do Seridó Potiguar	15
3.2 Produção de Queijo de Coalho no Seridó potiguar	16
3.2.1 Legislação e Regulamentação da Produção de Queijo Artesanal no Brasil e no Rio Grande do Norte	19
3.3 Bactérias Ácido Láticas	21
3.4 Extração de DNA de Bactérias Ácido Láticas	23
3.5 Técnicas de Caracterização Molecular das Bactérias Ácido Láticas	24
3.6 Caracterização Molecular pelo Gene 16S rRNA	26
REFERÊNCIAS	28
4. ANÁLISES METATAXONÔMICAS DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM QUEIJO DE COALHO ARTESANAL DO BIOMA CAATINGA	33
4.1 INTRODUÇÃO	35
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.2.1 Coleta e preparo das amostras de queijo de coalho artesanal	36
4.2.2 Composição físico-química das amostras de queijo	38
4.2.3 Determinação do pH e acidez titulável	39
4.2.4 Determinação da umidade	39
4.2.5 Determinação do teor de gordura	39
4.2.6 Determinação de proteínas	39
4.3 Extração de DNA e caracterização molecular pelo gene 16S rRNA das BAL	40
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.4.1 Propriedades físico-químicas das amostras de queijo de coalho artesanal da região do Seridó, estado do Rio Grande do Norte	42
4.4.2 Composição taxonômica da microbiota do queijo de coalho do Seridó do Rio Grande do Norte	45
4.4.3 Caracterização e diversidade microbiológica do queijo de coalho artesanal da região do Seridó, estado do Rio Grande do Norte	48
4.4.4 Bactérias lácticas predominantes	50
a) Enterococcus spp.	50
b) Lactococcus spp.	52
c) Leuconostoc spp.	53
d) Streptococcus spp.	54
4.4.5 Microrganismos oportunistas e contaminantes ambientais	55

4.5 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE A. REGISTRO FOTOGRÁFICO DA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL.....	67
.....	67

1. INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é um produto de grande relevância econômica, social e cultural no Brasil, especialmente na região Nordeste, onde sua produção artesanal é tradicionalmente associada ao modo de vida rural e à propagação de saberes entre gerações. No estado do Rio Grande do Norte, a sub-região do Seridó Potiguar destaca-se como um dos principais polos produtores desse tipo de queijo, cuja fabricação, predominantemente em pequena escala, preserva métodos tradicionais e práticas empíricas de processamento. As características sensoriais específicas desse produto, como aroma, sabor e textura, conferem-lhe reconhecimento e valorização regional, reforçando sua importância tanto para o mercado local quanto para a identidade cultural da região (OLIVEIRA et al., 2018; SILVA et al., 2020).

A produção artesanal do queijo de coalho envolve processos de fermentação natural, nos quais a microbiota autóctone desempenha papel determinante na formação das propriedades organolépticas e na segurança do produto final. Entre os principais grupos microbianos, destacam-se as bactérias ácido lácticas (BAL), reconhecidas por sua capacidade de promover a fermentação láctica, a acidificação do leite e o desenvolvimento de atributos sensoriais desejáveis, como aroma, textura e sabor (ROCHA et al., 2021). Além desses efeitos tecnológicos, as BAL também exercem funções de biopreservação, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes por meio da produção de metabólitos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (PEREIRA et al., 2019).

Nos últimos anos, a aplicação de ferramentas moleculares para a caracterização da microbiota de alimentos fermentados tem permitido avanços significativos no conhecimento da diversidade microbiana e de sua relação com as propriedades sensoriais e de segurança dos produtos (CAMARGO et al., 2021). No Brasil, estudos envolvendo o Queijo Minas Artesanal (QMA) e o Queijo Serrano demonstraram comunidades microbianas complexas, compostas majoritariamente por espécies dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*, além de outros microrganismos com potencial tecnológico e de segurança alimentar (PERIN et al., 2017).

Contudo, para o queijo de coalho artesanal do Seridó Potiguar, ainda não foram encontrados estudos que utilizem o sequenciamento do gene 16S rRNA para descrever de forma detalhada sua microbiota. Na condição dessa lacuna de conhecimento, Silva (2024) relatou uma expressiva variabilidade nas contagens de BAL, além da presença recorrente de microrganismos indesejáveis em amostras coletadas na região do Seridó Potiguar, mostrando deficiências nas Boas Práticas de Fabricação (BPF) adotadas pelos produtores locais. Esses achados reforçam a

necessidade de investigações que aprofundem o conhecimento sobre a microbiota desse produto, especialmente por meio de abordagens moleculares que possibilitem uma identificação taxonômica mais precisa das espécies presentes e forneçam subsídios para o aprimoramento das práticas de produção, sem comprometer as características sensoriais e culturais do queijo artesanal.

Diante desse cenário, este trabalho tem como objetivo analisar qualitativamente as bactérias ácido lácticas presentes no queijo de coalho artesanal do Seridó Potiguar, por meio da identificação taxonômica através do sequenciamento do gene 16S rRNA e da análise da diversidade genética das cepas identificadas. Espera-se que os resultados obtidos ampliem o conhecimento científico sobre a microbiota regionalmente adaptada a esse produto, contribuindo para a valorização do queijo de coalho do Seridó por meio da comprovação de sua identidade microbiológica. Além disso, os dados gerados poderão subsidiar iniciativas futuras voltadas à preservação da tipicidade, à padronização da qualidade e ao fortalecimento de estratégias de certificação e reconhecimento no mercado.

2.OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente as bactérias ácido lácticas presentes no queijo de coalho artesanal produzido na região do Seridó Potiguar.

2.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar as propriedades físico-químicas do queijo de coalho artesanal do Seridó Potiguar (umidade, pH, proteína, gordura e acidez), a partir dos dados obtidos, expressando os resultados como média $\pm$ desvio padrão.
- Avaliar a diversidade microbiana das amostras por meio dos resultados de sequenciamento da região V3–V4 do gene 16S rRNA.
- Descrever a taxonomia das bactérias identificadas e discutir sua relevância tecnológica na produção artesanal de queijo de coalho.
- Identificar e analisar os gêneros predominantes de bactérias ácido lácticas (BAL), destacando suas propriedades funcionais e tecnológicas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Região do Seridó Potiguar

A Região do Seridó Potiguar está situada na porção centro-sul do estado do Rio Grande do Norte, abrangendo vinte e cinco municípios e caracterizando-se por clima semiárido, vegetação de Caatinga, solos arenosos e rios temporários (IBGE, 2024). O território é cortado pelos rios Piranhas-Açu e Seridó, cuja água, embora escassa, é essencial para atividades agropecuárias, incluindo a produção de leite, base do queijo de coalho artesanal (AGUIAR, 2020).

O Seridó é dividido em quatro microrregiões: Seridó Oriental, Seridó Ocidental, Serra de Santana e parte do Vale do Açu (ALMEIDA, 2018). Entre os municípios, Caicó se destaca por possuir o maior número de habitantes com cerca de 61.246 pessoas e uma posição central na economia regional, incluindo a produção de laticínios artesanais (IBGE 2024).

Historicamente, a economia da região dependia da cotonicultura e da mineração, mas ao longo do século XX, a bovinocultura leiteira tornou-se a atividade predominante. Atualmente, cerca de 90% dos produtores locais mantêm bovinos voltados à produção de leite (CAVALCANTE, 2017). Esse cenário consolidou o Seridó como uma das principais regiões produtoras de queijo de coalho artesanal, produto tradicional da culinária nordestina, reconhecido por sua textura firme e sabor característico (OLIVEIRA, 2018).

O queijo de coalho do Seridó reflete a interação entre os aspectos naturais e culturais da região: o tipo de pastagem, a água disponível, as condições climáticas e o manejo artesanal influenciam diretamente na microbiota do leite e na qualidade do produto final. A produção artesanal também está profundamente ligada às tradições locais, reforçando a identidade cultural e econômica do Seridó (SALVADOR et al., 2019).

Além disso, a região conta com o Geoparque Seridó, reconhecido pela UNESCO como Geoparque Mundial. Esse território, que abrange municípios como Acari, Carnaúba dos Dantas, Cerro Corá, Currais Novos, Lagoa Nova e Parelhas, é valorizado por sua relevância geológica, cultural e ambiental, incentivando práticas sustentáveis que impactam a produção local, incluindo o queijo artesanal (UNESCO, 2022; GEOPARQUE SERIDÓ, 2022).

O queijo de coalho artesanal do Seridó Potiguar não é apenas um produto alimentar, mas um elemento cultural e econômico que reflete as condições ambientais, históricas e

sociais da região. Sua produção depende da sinergia entre a tradição local, os recursos naturais do semiárido nordestino e a atividade das bactérias ácido lácticas, que conferem ao queijo sua textura característica, sabor levemente ácido e propriedades conservantes, consolidando o Seridó como um polo de laticínios artesanais de relevância nacional (IBANDRN, 2023).

3.2 Produção de Queijo de Coalho no Seridó potiguar

O queijo de coalho é um produto tradicional brasileiro de elevado valor cultural e econômico, amplamente consumido nas regiões Norte e, especialmente, no Nordeste do país. Caracterizado por sua textura firme, sabor suave e aroma levemente ácido, destaca-se por sua capacidade de formar uma crosta dourada e tostada quando submetido ao calor, sendo muito apreciado na forma grelhada. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ), aprovado pela Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001, o queijo de coalho é definido como o “produto obtido por coagulação do leite por meio de coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, seguido de dessoragem, podendo ser consumido fresco ou após maturação” (BRASIL, 2001). A Figura 1 apresenta um fluxograma ilustrativo das principais etapas envolvidas na produção artesanal do queijo de coalho, com base em práticas tradicionais observadas em unidades familiares do semiárido nordestino. Essa representação visa facilitar a compreensão do processo, valorizando o saber-fazer local e os métodos empíricos que conferem identidade ao produto.

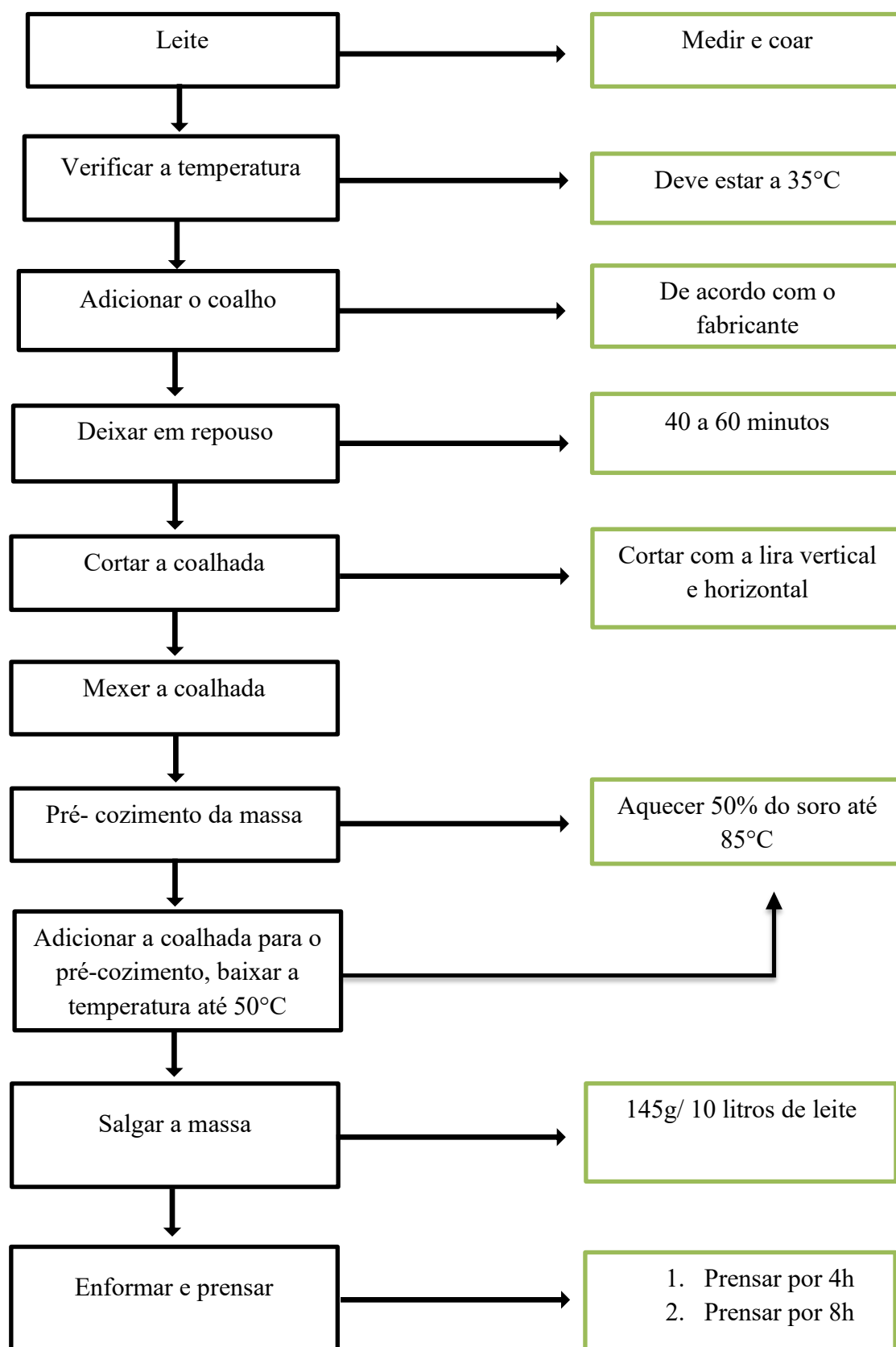


Figura 1 – Fluxograma da produção artesanal de queijo de coalho, com base em práticas adotadas por produtores familiares no semiárido nordestino. Fonte: Elaboração própria, adaptada de dados de campo e literatura científica (2025).

Esse tipo de queijo é classificado como de média a alta umidade, com massa semi-cozida ou cozida. Do ponto de vista sensorial, sua crosta é fina, sem trincas ou formação de casca definida, com coloração branco-amarelada, odor levemente ácido e sabor que pode variar de brando a ligeiramente ácido, com teor salino de leve a acentuado como ilustrado na Tabela 1 (RIBEIRO, 2023). Em termos nutricionais, trata-se de um alimento rico em proteínas de alto valor biológico, lipídios, cálcio, fósforo e vitaminas lipossolúveis, como A, D e E (SANTOS et al., 2021). A maturação influencia significativamente essas características, promovendo redução da umidade, aumento dos sólidos totais e diminuição do pH, o que intensifica sua acidez e potencializa propriedades funcionais, como atividades antioxidantes e anti-hipertensivas embora tais propriedades tendam a declinar após 60 dias (BEZERRA, 2024).

Tabela 1. Características físico-químicas típicas do queijo de coalho artesanal, conforme relatado na literatura. Os valores refletem faixas comumente encontradas em queijos produzidos artesanalmente no Nordeste brasileiro, incluindo parâmetros de acidez (pH e acidez titulável), composição centesimal (umidade, proteínas, gordura, sólidos totais e sólidos não-gordurosos), minerais (cálcio e sódio).

Parâmetro	Unidade	Valor típico	Referência / Fonte
pH	—	5,0 – 6,2	Marques et al., 2021;
Acidez titulável	%	0,25 – 0,60	Costa, 2019;
Umidade	%	45 – 55	Costa, 2019;
Proteína	%	18 – 25	Saraiva et al., 2023;
Gordura	%	20 – 28	Costa, 2019;
Sólidos totais	%	45 – 55	Saraiva et al., 2023
Sólidos não-gordurosos	%	25 – 30	Silva et al., 2021
Cálcio	%	0,6 – 1,0	Silva et al., 2021
Sódio	%	0,5 – 1,2	Silva et al., 2021

A produção artesanal de queijo de coalho no Brasil ocorre predominantemente de forma informal e com o uso de leite cru, o que favorece o desenvolvimento de uma microbiota autóctone que confere ao produto características sensoriais e funcionais específicas (OLIVEIRA, 2018). As bactérias ácido lácticas (BAL) exercem papel fundamental nesse processo, atuando na fermentação, acidificação e na segurança microbiológica do queijo (PEREIRA et al., 2019). Fatores como a localização geográfica, o clima e os métodos artesanais de produção influenciam a composição dessa microbiota

(ALMEIDA et al., 2019). Durante a maturação, essas bactérias promovem a hidrólise de proteínas, como as caseínas e proteínas do soro, resultando na liberação de peptídeos bioativos com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e inibidoras da enzima conversora de angiotensina (ECA), as quais são associadas à prevenção de doenças crônicas, como hipertensão arterial e processos inflamatórios (RANGEL et al., 2023; BEZERRA et al., 2024).

Entretanto, a utilização do leite cru impõe desafios sanitários relevantes. A ausência de tratamento térmico eleva o risco de contaminação por patógenos, exigindo controle rigoroso da qualidade da matéria-prima e das condições de higiene. Apesar desses riscos, estudos demonstram que a microbiota natural do leite cru, especialmente as BAL, pode contribuir para a biopreservação do queijo por meio da produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas e outras substâncias com ação antimicrobiana (RODRIGUES et al., 2021; ROCHA et al., 2021).

No semiárido nordestino, destaca-se a sub-região do Seridó Potiguar, localizada no estado do Rio Grande do Norte, como um relevante polo de produção artesanal de queijo de coalho. A economia local é historicamente alicerçada na agricultura familiar e na pecuária extensiva, especialmente voltada à criação de caprinos, ovinos e bovinos. As condições climáticas semiáridas favorecem o uso de pastagens nativas e técnicas adaptadas à escassez hídrica, o que influencia diretamente a composição do leite utilizado na produção artesanal. Nesse cenário, a fabricação do queijo de coalho com leite cru e métodos empíricos de fermentação natural resulta em um produto de sabor, textura e identidade sensorial únicos, marcado por características microbiológicas e físico-químicas próprias, que reforçam sua autenticidade e conexão com o território de origem (ALMEIDA, 2022).

3.2.1 Legislação e Regulamentação da Produção de Queijo Artesanal no Brasil e no Rio Grande do Norte

O Decreto Federal nº 11.099, de 21 de junho de 2022, regulamenta o artigo 10-A da Lei nº 1.283/1950 e a Lei nº 13.860/2019, estabelecendo normas para a produção e comercialização de alimentos de origem animal produzidos artesanalmente no Brasil. Essa norma institui o Selo Queijo Artesanal, que identifica queijos feitos por métodos tradicionais e vinculados a regiões específicas, valorizando a cultura local e incentivando a formalização dos produtores (BRASIL, 2022a). Além disso, o decreto define responsabilidades fiscais e autoriza a comercialização em todo o território nacional, assegurando a segurança sanitária.

O Decreto nº 9.918/2019 criou o Selo Arte, certificado para produtos alimentícios de origem animal elaborados artesanalmente com receita tradicional e regional. Abrange queijos, carnes, pescados e produtos apícolas, permitindo a comercialização interestadual. O Selo Queijo Artesanal, exclusivo para queijos artesanais, reforça a tradição e o vínculo regional, agregando valor e ampliando mercados (BRASIL, 2019; MAPA, 2022a).

A fabricação tradicional de queijos com leite cru diverge da exigência sanitária da pasteurização, pois produtores defendem que o processo térmico modifica o sabor ao eliminar microrganismos naturais. Para conciliar essa questão, o Rio Grande do Norte aprovou legislação específica para a produção artesanal. A Lei Estadual nº 10.230/2017, chamada Lei Nivardo Mello, regula a fabricação e comercialização de queijos e manteigas artesanais no RN. Define como artesanais os produtos feitos com leite cru, recém-ordenhado, integral ou desnatado, coagulado por coalho natural ou industrial, sem aditivos químicos, preservando características tradicionais e regionais (RIO GRANDE DO NORTE, 2017).

A legislação estadual também exige que os rebanhos estejam livres de brucelose e tuberculose, alinhando-se às boas práticas federais de fabricação (RIO GRANDE DO NORTE, 2017). O Decreto nº 31.136/2021 regulamenta a lei estadual, detalhando normas sobre sanidade, higiene, estrutura, registro e fiscalização dos estabelecimentos. Ressalta o controle sanitário do rebanho, higiene na ordenha, adoção das Boas Práticas de Produção Artesanal (BPPA) e a necessidade de registro nos órgãos competentes (RIO GRANDE DO NORTE, 2021).

Minas Gerais foi pioneiro com a Lei nº 20.549/2012, que regula o uso de leite cru na produção artesanal, priorizando o leite próprio do estabelecimento, com exceções para pequenos produtores agrupados. Outros estados nordestinos possuem legislações similares, como Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco, enquanto outros ainda desenvolvem normas específicas (BRASIL, 2022b). A inspeção sanitária no Brasil é organizada em três níveis: municipal (SIM), estadual (SIE, no RN SEIPOA) e federal (SIF), cada um autorizando comercialização em diferentes esferas geográficas (XAVIER et al., 2025).

A implementação do SISBI-POA no Rio Grande do Norte, com destaque para Mossoró como primeiro município do Norte-Nordeste a obter reconhecimento nacional, representa um avanço significativo na segurança alimentar e na possibilidade de comercialização ampliada dos queijos artesanais (G1 RN, 2020). Dentro desse panorama regulatório, a caracterização e o monitoramento das bactérias ácido lácticas (BAL) presentes nos queijos de coalho tornam-se fundamentais, pois essas comunidades microbianas não apenas contribuem para as propriedades sensoriais e funcionais do produto, mas também

desempenham papel crucial na qualidade, preservação e inocuidade, alinhando a tradição artesanal às exigências regulatórias do sistema de inspeção

3.3 Bactérias Ácido Láticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) são microrganismos de grande impacto nos processos de fermentação de alimentos, desempenhando funções essenciais tanto para a qualidade sensorial quanto para a segurança dos produtos alimentícios. Esses microrganismos são caracterizados principalmente pela capacidade de fermentar carboidratos, especialmente a lactose, produzindo ácido láctico como um dos principais produtos metabólicos (DE VUYST et al., 2018). Essa produção de ácido láctico contribui para a acidificação do meio, o que não apenas confere características sensoriais específicas ao produto, como sabor e textura, mas também atua como um mecanismo natural de inibição de microrganismos patogênicos e deteriorantes (LIU et al., 2019).

Essas bactérias desempenham um papel central na produção de queijos artesanais. Elas são responsáveis por promover o desenvolvimento do sabor, a textura e a conservação do produto. Além disso, a seleção de culturas iniciadoras ricas em BAL tem demonstrado impacto positivo tanto no rendimento quanto nas características sensoriais do queijo, contribuindo para uma produção mais eficiente e com maior aceitação sensorial (SALES et al., 2016).

As BAL pertencem principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, sendo comumente encontradas em produtos fermentados de origem vegetal, animal e láctea. Entre essas, as espécies de *Lactobacillus* e *Lactococcus* são amplamente utilizadas na indústria alimentícia devido à sua versatilidade e capacidade de atuar em uma ampla variedade de condições ambientais (KHALID, 2019). Além de seu papel na produção de ácido láctico, essas bactérias produzem compostos antimicrobianos adicionais, como peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que aumentam ainda mais sua capacidade de biopreservação e garantem a segurança microbiológica dos alimentos fermentados (COTTER et al., 2019).

No ambiente da produção de alimentos, as BAL exercem uma série de funções metabólicas que são de grande interesse para produtores e consumidores. Elas contribuem para o desenvolvimento de compostos aromáticos, como aldeídos, ésteres e diacetil, que são responsáveis pelos sabores característicos de produtos fermentados, como queijos e iogurtes (DE VUYST et al., 2020). Além disso, as BAL desempenham um papel relevante na digestibilidade e no valor nutricional dos alimentos fermentados, promovendo a degradação

de proteínas e a liberação de peptídeos bioativos com propriedades benéficas à saúde, como ação antioxidante, anti-hipertensiva e imunomoduladora (OUWEHAND e VESTERLUND, 2021).

A capacidade das BAL de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos é um dos aspectos mais estudados na microbiologia de alimentos. Por meio da produção de compostos antimicrobianos, as BAL são capazes de criar um ambiente hostil para a sobrevivência de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (GÄNZLE, 2015). Essa ação de biocontrole é especialmente importante em produtos de fermentação natural, como queijos artesanais, onde a ausência de aditivos químicos exige métodos naturais de preservação (DE ANGELIS E GOBBETTI, 2018). Nesse sentido, as BAL atuam como agentes de biopreservação, garantindo que os produtos fermentados sejam seguros para o consumo e, ao mesmo tempo, mantendo sua integridade sensorial e nutricional.

A caracterização molecular dessas bactérias tem sido cada vez mais utilizada para identificar espécies específicas e avaliar a diversidade genética desses microrganismos em diferentes produtos fermentados. Técnicas como o sequenciamento do gene 16S rRNA e a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) têm sido fundamentais para a identificação precisa das cepas de BAL e para o entendimento de sua distribuição em microbiotas complexas (PARVEZ et al., 2017). Esse tipo de caracterização não apenas fornece informações sobre a ecologia microbiana dos alimentos, mas também auxilia na seleção de cepas com propriedades desejáveis para uso industrial e na produção de alimentos funcionais, especialmente no desenvolvimento de produtos probióticos e de culturas iniciadoras (SHOUKAT et al., 2025).

As BAL desempenham um papel multifacetado na produção de alimentos fermentados, influenciando diretamente a qualidade, a segurança e o valor nutricional desses produtos. Suas características metabólicas, associadas à capacidade de produzir compostos antimicrobianos e bioativos, tornam essas bactérias essenciais para a fermentação e preservação natural de alimentos, além de contribuírem para o desenvolvimento de alimentos funcionais com benefícios à saúde humana (KHUSHBOO et al., 2023). Pensando nisto, a extração eficiente de DNA de BAL constitui uma etapa crucial para sua caracterização molecular, permitindo a identificação de cepas e o monitoramento da microbiota presente nos alimentos. Essa abordagem molecular fortalece o uso racional e seguro das BAL em produtos alimentares, conectando tradição e inovação científica.

3.4 Extração de DNA de Bactérias Ácido Láticas

A extração de DNA constitui uma etapa fundamental e estratégica nos estudos de caracterização molecular de bactérias ácido láticas (BAL), especialmente em investigações voltadas à microbiota de alimentos fermentados. A confiabilidade das análises genômicas subsequentes depende diretamente da obtenção de material genético de alta qualidade, pureza e integridade. No entanto, a complexidade estrutural da parede celular dessas bactérias, composta predominantemente por peptidoglicanos, impõe desafios específicos ao processo de quebra da parede celular, exigindo protocolos otimizados (ALI et al., 2022).

Diversos métodos têm sido empregados para garantir a eficiente extração do DNA de BAL, combinando abordagens físicas, químicas, mecânicas e enzimáticas. Entre os procedimentos mais utilizados estão a lise mecânica com pérolas de vidro ou magnéticas, ciclos de congelamento e descongelamento, sonicação e a aplicação de enzimas como lisozima e proteinase K, que atuam na degradação da parede celular e liberação do conteúdo intracelular (KRAUSE et al., 2021). Em seguida, a purificação do DNA é realizada por meio de precipitação com etanol ou isopropanol, colunas de afinidade ou esferas magnéticas, com o objetivo de eliminar contaminantes como proteínas, lipídios e resíduos celulares, que podem interferir em análises moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou o sequenciamento de nova geração (NGS) (NEOPROSPECTA, 2023).

Recentemente, têm sido desenvolvidos protocolos específicos para a extração de DNA em alimentos fermentados, os quais consideram as particularidades das BAL e a complexidade das matrizes alimentares, como os queijos, que apresentam altos teores de gordura e proteína (ZHANG et al., 2023). A padronização desses métodos é essencial para assegurar a reprodutibilidade dos dados e a precisão na identificação taxonômica, especialmente em estudos baseados em metagenômica e tipagem genética.

Dessa forma, a escolha do protocolo de extração deve levar em conta o tipo de amostra, os objetivos da pesquisa e os recursos laboratoriais disponíveis. A extração eficiente de DNA representa, portanto, um passo determinante para o sucesso das análises moleculares envolvendo BAL, sendo indispensável para a compreensão da ecologia microbiana de alimentos fermentados e para a seleção de cepas com potencial tecnológico e funcional para aplicação industrial.

3.5 Técnicas de Caracterização Molecular das Bactérias Ácido Láticas

A caracterização molecular das bactérias ácido lácticas (BAL) é uma etapa fundamental para a identificação das cepas, a análise da diversidade genética e a compreensão das funções metabólicas desses microrganismos em produtos fermentados. Tais métodos superam as limitações dos procedimentos fenotípicos convencionais, os quais frequentemente não conseguem distinguir espécies próximas devido à similaridade morfológica ou à plasticidade metabólica influenciada por variações ambientais (HARYANI et al., 2023). O uso de técnicas moleculares tem se consolidado na microbiologia de alimentos, especialmente em queijos artesanais, onde as BAL são essenciais para a condução da fermentação, o desenvolvimento sensorial e a segurança do produto final.

Entre as metodologias moleculares mais utilizadas, o sequenciamento do gene 16S rRNA destaca-se por sua ampla aplicação na identificação taxonômica de BAL. Esse gene apresenta regiões altamente conservadas entre as bactérias, intercaladas por regiões hipervariáveis que permitem a discriminação entre gêneros e espécies. Estudos recentes utilizando *amplicon sequencing* de 16S rRNA demonstraram alta sensibilidade na detecção de espécies dominantes como *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus* em queijos artesanais, com cobertura superior a 99% da microbiota total (BETTERA et al., 2023). Em queijos de mozzarella de búfala produzidos no Brasil, a técnica também possibilitou o mapeamento da sucessão de 152 isolados de BAL ao longo do processamento e maturação, confirmada por meio do sequenciamento 16S aliado a ferramentas complementares como RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR*) (SILVA et al., 2022).

No campo das técnicas de amplificação gênica, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variantes continuam sendo amplamente utilizadas na caracterização de BAL. Métodos como PCR-DGGE, rep-PCR e RAPD-PCR permitem não apenas a amplificação de fragmentos específicos de DNA, mas também a avaliação da diversidade intraespecífica com alta sensibilidade, mesmo em populações bacterianas minoritárias. Ferreira et al. (2022) demonstraram, em queijos artesanais de Minas Gerais, que a combinação de PCR-DGGE e rep-PCR foi eficaz na identificação de *Lactococcus lactis* e *Streptococcus salivarius*, evidenciando a homogeneidade genética entre diferentes produtores. Embora a RAPD-PCR apresente menor reprodutibilidade, ainda é aplicada para tipagem genética e agrupamento de

cepas, sobretudo quando combinada com técnicas como RFLP-PCR em regiões como tRNA-ALA-23S.

Dentre as técnicas complementares, o Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) se destaca por sua eficácia na tipagem genética de BAL. Essa técnica baseia-se na digestão de fragmentos amplificados de DNA por enzimas de restrição específicas, seguida de separação eletroforética. Hajigholizadeh et al. (2020), ao aplicarem a RFLP do gene 16S rRNA em queijos tradicionais iranianos, demonstraram sua capacidade de distinguir com precisão os gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, com associação aos perfis de atividade antimicrobiana observados. De forma complementar, Laref e Belkheir (2022) utilizaram simulações *in silico* do RFLP e mostraram sua utilidade na diferenciação de espécies filogeneticamente próximas, como *Lacticaseibacillus spp.*, ampliando o escopo funcional e taxonômico da técnica.

Nas últimas décadas, as técnicas de sequenciamento de nova geração (Next-Generation Sequencing - NGS) promoveram avanços substanciais na análise de comunidades microbianas complexas. Essas plataformas, como *Illumina* e *Ion Torrent*, permitem não apenas a identificação taxonômica da microbiota, mas também a detecção de genes funcionais, variantes intraespecíficas (SNVs) e reconstrução de genomas metagenômicos (MAGs). Em queijos artesanais de longa maturação, como o Gouda, Decadt et al. (2025) utilizaram a metagenômica *shotgun* para identificar linhagens adaptadas às condições do processo fermentativo, como *Lactococcus cremoris* e *Lacticaseibacillus paracasei*, além de genes associados à produção de bacteriocinas e assimilação de substratos. No Brasil, estudos conduzidos por Kothe, Mohellibi e Renault (2022) revelaram microbiotas distintas em diferentes regiões, com predominância de espécies de BAL associadas a propriedades sensoriais e tecnológicas, além de genes ligados à resistência antimicrobiana e ao metabolismo da lactose.

Complementarmente, abordagens integradas entre metagenômica, volatilômica e metabolômica têm sido aplicadas com sucesso na investigação do papel funcional das BAL em queijos artesanais. Wang et al. (2024) demonstraram que cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* estavam fortemente associadas à produção de compostos voláteis, como acetato de etila, ácido butanoico e acetaldeído, que conferem aroma e sabor característicos aos queijos. Tais análises reforçam a importância da microbiota na modulação sensorial dos produtos fermentados, além de seu papel na segurança e qualidade tecnológica.

Entre as inovações mais recentes, destaca-se o sequenciamento por nanoporos, uma tecnologia de leitura longa desenvolvida pela *Oxford Nanopore Technologies*. Essa

abordagem tem ganhado destaque na análise de microbiotas de alimentos fermentados devido à sua capacidade de gerar *long reads*, que permitem maior resolução taxonômica e montagem de genomas completos sem a necessidade de fragmentação prévia do DNA. Estudos conduzidos por Decadt et al. (2025) revelaram que o uso da plataforma MinION™ permitiu a identificação de BAL em nível intraespecífico, além da detecção de genes relacionados à produção de compostos bioativos e resistência a bacteriófagos em queijos de longa maturação. Wang et al. (2024) também demonstraram a aplicação dessa técnica na reconstrução de MAGs e na análise funcional de microbiotas complexas. Embora a taxa de erro por leitura individual ainda seja superior à de tecnologias como *Illumina*, o uso de algoritmos de *basecalling* avançados, como *Guppy* e *Bonito*, e a combinação com dados de curta leitura têm aumentado substancialmente a acurácia das análises. Além disso, a capacidade de sequenciamento em tempo real e a flexibilidade de protocolos tornam o sequenciamento por nanoporos uma alternativa promissora e acessível para laboratórios que trabalham com produtos lácteos artesanais.

A caracterização molecular das BAL por meio de técnicas como o sequenciamento do gene 16S rRNA, PCR, RFLP, NGS e, mais recentemente, o sequenciamento por nanoporos, tem sido fundamental para o avanço do conhecimento sobre a microbiota de queijos artesanais. A aplicação dessas metodologias proporciona uma identificação mais eficaz, avaliação da diversidade genética, análise funcional e tipagem de cepas tecnológicas, contribuindo não apenas para a valorização e preservação dos saberes tradicionais, mas também para o desenvolvimento de políticas públicas voltadas à rastreabilidade, à segurança alimentar e à inovação biotecnológica no setor lácteo artesanal.

3.6 Caracterização Molecular pelo Gene 16S rRNA

A caracterização molecular de bactérias ácido lácticas (BAL) por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA permanece como uma das abordagens mais robustas e amplamente utilizadas na microbiologia de alimentos, especialmente na identificação taxonômica e na análise da diversidade microbiana em produtos fermentados. O gene 16S rRNA, responsável por codificar a subunidade menor do ribossomo 30S, apresenta regiões altamente conservadas intercaladas por segmentos hipervariáveis, permitindo a distinção entre gêneros e, em muitos casos, entre espécies bacterianas (LENKA et al., 2024).

A amplificação das regiões alvo do 16S rRNA é realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cuja eficiência depende da escolha adequada dos *primers* e das condições de termociclagem. O protocolo típico da PCR envolve as etapas de desnaturação

do DNA a 94 °C, anelamento dos *primers* entre 50–60 °C e extensão a 72 °C. Para a amplificação das regiões V3–V4 frequentemente utilizadas em estudos de microbiota são comumente empregados os *primers* 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), que apresentam elevada especificidade para bactérias presentes em matrizes alimentares complexas (CALLAHAN et al., 2022).

Após a amplificação, as sequências obtidas são analisadas por ferramentas bioinformáticas e comparadas com bases de dados amplamente reconhecidas, como, RDP e NCBI, permitindo a identificação taxonômica precisa das comunidades microbianas (Quast et al., 2013; Liu et al., 2023). Essa estratégia é especialmente útil na análise de alimentos fermentados à base de leite cru, nos quais microrganismos viáveis, porém não cultiváveis, desempenham papel essencial na fermentação e no desenvolvimento de propriedades sensoriais únicas (HAN et al., 2024).

Nos estudos voltados para produtos lácteos artesanais, o sequenciamento do gene 16S rRNA tem revelado a presença recorrente de espécies com propriedades tecnológicas desejáveis, como *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Enterococcus faecium*, associadas à acidificação do leite, produção de compostos aromáticos e segurança microbiológica (FERREIRA et al., 2022; BETTERA et al., 2023). Simultaneamente, essa técnica tem permitido o rastreamento de espécies potencialmente patogênicas ou oportunistas, como *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae*, contribuindo para a avaliação do risco microbiológico de alimentos artesanais (KOTHE et al., 2022).

Dessa forma, a utilização do gene 16S rRNA na caracterização molecular de BAL representa uma ferramenta indispensável tanto para o mapeamento da diversidade microbiana quanto para a seleção e o monitoramento de cepas com potencial tecnológico e funcional. Sua aplicação fortalece o controle sanitário e a valorização da microbiota autóctone em produtos fermentados tradicionais, colaborando para a inovação e a segurança no setor de alimentos lácteos fermentados artesanais.

Portanto, a análise do gene 16S rRNA constitui uma abordagem essencial para mapear a diversidade microbiana e monitorar cepas com potencial tecnológico e funcional em queijos artesanais (COGAN et al., 2019). Esse conhecimento reforça a valorização da microbiota autóctone, apoia a inovação na produção de queijos de coalho e fornece bases sólidas para o controle de qualidade e a segurança alimentar (BEZERRA, 2022). Com esses objetivos em mente, o presente estudo descreve, a seguir, os procedimentos adotados na coleta, processamento e análise das amostras, conforme detalhado em Material e Métodos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, S. C.; LIMA, V. L. A. de; SILVA, P. F. da; DANTAS NETO, J.; FARIAS, M. S. S. de. **Sustentabilidade da pecuária leiteira do semiárido brasileiro com base em vulnerabilidade e resiliência socioecológica.** *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 11, n. 2, p. 236–248, 2020. DOI: <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2020.002.0025>
- ALMEIDA, J. S.; SILVA, M. F.; PEREIRA, L. B. **Produção de queijo coalho no Nordeste brasileiro: características regionais e microbiota associada.** *Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 14, n. 2, p. 30-46, 2019.
- AYIVI, R. D., & IBRAHIM, S. A. (2022). **Lactic acid bacteria: an essential probiotic and starter culture for the production of yoghurt.** *International Journal of Food Science & Technology*, 57(11), 7008–7017. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16076>.
- ALMEIDA, J. P. de; SANTOS, F. A. dos; SOUSA, R. C. C. de. **Potencialidades e desafios do Arranjo Produtivo Local de cerâmica vermelha no Seridó do RN.** *Revista Geoconexões*, v. 10, n. 1, p. 67–82, 2021. Disponível em: <https://revistas.unilab.edu.br/index.php/geoconexoes/article/view/870>. Acesso em: 7 maio 2025.
- BRASIL. Decreto nº 9.918, de 20 de agosto de 2019. **Institui o Selo Arte para produtos artesanais.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 ago. 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-9.918-de-20-de-agosto-de-2019-174141775>. Acesso em: 12 ago. 2025.
- BRASIL. Decreto nº 11.099, de 21 de junho de 2022. **Regulamenta a elaboração e comercialização de produtos alimentícios de origem animal produzidos artesanalmente no Brasil e institui o Selo Queijo Artesanal.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 jun. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-11.099-de-21-de-junho-de-2022-398471759>. Acesso em: 12 ago. 2025.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Selo Arte e Selo Queijo Artesanal: incentivo à comercialização de produtos artesanais.** Brasília, 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/selo-arte-avanco-para-produtos-artesanais-brasileiros>. Acesso em: 12 ago. 2025.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Sistemas de inspeção para produtos de origem animal no Brasil.** Brasília, 2022c. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/sistemas-de-inspecao>. Acesso em: 12 ago. 2025.
- BEZERRA, D. A. F. V. A. et al. **Effect of ripening time on the content of bioactive peptides and fatty acids profile of Artisanal Coalho cheese.** *PLOS ONE*, San Francisco, v. 19, n. 7, e0306552, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0306552>. Acesso em: 25 maio 2025.

BETTERA, L. et al. **Lactic acid bacteria in cow raw milk for cheese production: Which and how many?** *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 13, e1092224, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1092224>. Acesso em: 2 jul. 2025.

BORGES, José Lucas Coutinho. **Análise físico-química e sensorial de queijo coalho condimentado e produzido com leite integral e semidesnatado de vacas mestiças.** 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/27392>.

CAVALCANTE, L. A. et al. **Determinação do tempo mínimo de maturação do queijo coalho artesanal do Ceará.** *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 6, n. 1, p. 35-49, 2022. Disponível em: <https://www.uece.br/wp-content/uploads/2024/07/Cap.-22-Determina%C3%A7%C3%A3o-de-Tempo-M%C3%ADnimo-de-Matura%C3%A7%C3%A3o-do-QCA-CE-3.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2025.

CALLAHAN, B. J. et al. **DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data.** *Nature Methods*, [S.l.], v. 13, n. 7, p. 581–583, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth.3869>. Acesso em: 2 jul. 2025.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. **Bacteriocins: developing innate immunity for food.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 10, p. 777–788, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0213-4>.

DE VUYST, Luc; LEROY, Frederik. **Functional role of microbial consortia in cheese ripening.** *International Journal of Food Microbiology*, [s.l.], v. 324, p. 108627, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108627>.

DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. **Lactobacillus spp.: general characteristics.** In: **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2018. p. 33-66. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780429508497-2>.

FERREIRA, L. R.; de ALMEIDA, T. T.; ANDRETTA, M.; PERIN, L. M.; CAMARGO, A. C.; de CARVALHO, A. F.; NERO, L. A. **Further culture-independent characterization of the lactic microbiota of Serro artisanal cheese.** *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 53, n. 3, p. 1593–1598, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00778-2> Acesso em: 2 jul. 2025.

G1 RN. Mossoró é o 1º município do Norte e Nordeste a aderir ao SISBI. 2020. Disponível em: <https://g1.globo.com/rn/rio-grande-do-norte>. Acesso em: 7 maio 2025.

OLIVEIRA, S. L.; SANTOS, A. F. O. **Queijo coalho artesanal: tradição e valor cultural no nordeste brasileiro.** *Revista de Produtos Regionais*, v. 15, n. 2, p. 32-48, 2018.

GEOPARQUE SERIDÓ. **Aspectos Socioeconômicos dos Municípios.** 2025. Disponível em: https://geoparqueserido.com.br/?page_id=8182. Acesso em: 5 de maio 2025.

HAJIGHOLIZADEH, M. et al. **Molecular detection, phylogenetic analysis, and antibacterial performance of lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses, North-West Iran.** *Food Science and Nutrition*, Hoboken, v. 8, n. 11, p. 6007–6013, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1887>. Acesso em: 2 jul. 2025.

HARYANI, Y. et al. **Characterization, molecular identification, and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from selected fermented foods and beverages in Malaysia.** *FEMS Microbiology Letters*, [S.l.], v. 370, fnad023, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnad023>. Acesso em: 2 jul. 2025.

HAN, Dong et al. Metagenomics profiling of the microbial community and functional differences in solid-state fermentation vinegar starter (seed Pei) from different Chinese regions. *Frontiers in Microbiology*, [S.l.], v. 15, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1389737>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1389737>. Acesso em: 2 jul. 2025.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama regional do Seridó Potiguar. Rio de Janeiro: IBGE, 2023. Disponível em: <https://ibge.gov.br>. Acesso em: 7 maio 2025.

IBANDRN. **Rota do queijo potiguar: tradição secular de pequenos grandes empreendedores.** Natal: Ibandrn, 2023. Disponível em: <https://ibandrn.com.br/rota-do-queijo-potiguar-tradicao-secular-de-pequenos-grandes-empreendedores/>. Acesso em: 14 ago. 2025.

KHALID, K. **Probiotic bacteria: importance in the production of functional foods.** *Microbial Technology in Food Production*, v. 8, p. 90-108, 2019.

KRAUSE, L. et al. **Advances in microbiome research for fermented foods using 16S rRNA sequencing.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 114, p. 234–245, 2021.

KOTHE, C. I.; MOHELLIBI, N.; RENAULT, P. **Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics.** *Food Research International*, Amsterdam, v. 157, p. 111265, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111265>. Acesso em: 2 jul. 2025.

LENKA, Jessica; GONZÁLEZ-TORTUERO, Enrique; KUBA, Shweta; FERRY, Natalie. **Bacterial community profiling and identification of bacteria with lignin-degrading potential in different gut segments of African palm weevil larvae (*Rhynchophorus phoenicis*).** *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 15, 2024. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1401965>. Acesso em: 2 jul. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1401965>

LIU, W.; HAN, L.; ZHAO, Y. **Lactic acid bacteria in the production of dairy products: diversity and functionality.** *Journal of Dairy Microbiology*, v. 7, n. 4, p. 55-63, 2019.

OUWEHAND, A.; VESTERLUND, S. **Health benefits and functional properties of lactic acid bacteria in fermented foods.** *Functional Foods in Microbial Biotechnology*, v. 10, p. 75-92, 2021.

PEREIRA, M. V.; ROCHA, L. F.; SILVA, M. J. **Bactérias ácido-láticas: função e relevância na segurança alimentar de produtos lácteos.** *Journal of Dairy Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 65-78, 2019.

RANGEL, A. H. do N. et al. **An overview of the occurrence of bioactive peptides in different types of cheeses.** *Foods*, Basel, v. 12, n. 23, p. 4261, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12234261>.

RIBEIRO, J. C.; COSTA, R. T.; OLIVEIRA, M. A. **Bactérias ácido-láticas e segurança alimentar em produtos lácteos artesanais.** *Food Science and Technology*, Campinas, v. 43, e12123, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.2023.12123>.

ROCHA, C. M.; SILVA, P. R.; SANTOS, F. R. **Propriedades antimicrobianas de bactérias ácido-láticas e sua aplicação na biopreservação de queijos.** *Food Microbiology Journal*, v. 22, n. 1, p. 20-35, 2021.

SANTOS, M. A. G.; SOUZA, G. A.; SILVA, D. S. **Parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais do queijo de coalho maturado adicionado de pimenta.** *Acta Iguazu*, Cascavel, v. 10, n. 4, p. 130–140, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/LhXLJR4QhmV96D84kNZ3MqB>. Acesso em: 10 de maio 2025.

SALVADOR, A. P.; FERREIRA, M. J.; LIMA, R. F. **Qualidade microbiológica e físico-química de queijos artesanais brasileiros: desafios e perspectivas.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 74, n. 2, p. 123-134, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v74i2.820>.

SALES, D. C. et al. **Cheese yield in Brazil: state of the art.** *Food Science and Technology* (Campinas), Campinas, v. 36, n. 4, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1590/1678-457X.17116.

SILVA, D. S. et al. **Sistemas de inspeção sanitária e comercialização de produtos artesanais de origem animal no Brasil.** *Revista de Direito Sanitário*, v. 22, n. 3, p. 61–75, 2021. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9044.v22i3p61-75>.

SILVA, G. L. da; LOPES, J. R. **Território e resistência: os saberes locais no enfrentamento à seca no Seridó do RN.** *Revista Interdisciplinar do Semiárido Potiguar*, v. 12, n. 2, p. 28–43, 2022.

SILVA, J. B. A.; LIMA, P. O.; LIMA, R. N.; ROCHA, M. O. C.; PASSOS, Y. D. B. **Quality control in Coalho cheese in Brazil: a review.** 2022. *Revista Científica RSD*, 11(1). Disponível em: <https://rsdjournal.org/rsd/article/view/35290>. Acesso em: 04 set. 2025.

SHOUKAT, M. et al. **Iron fortification modifies the microbial community structure and metabolome of a model surface-ripened cheese.** *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 427, p. 110971, 16 jan. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110971>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39557002>. Acesso em: 6 jul. 2025.

XAVIER, R. H. I.; LIMBERGER, T. F. C. S. **Inspeção de produtos de origem animal.** *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, v. 11, n. 6, p. 3017–3024,

2025. Disponível em: <https://doi.org/10.51891/rease.v11i6.19999>. Acesso em: 12 ago. 2025.

**4. ANÁLISES METATAXONÔMICAS DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS
ÁCIDO LÁTICAS EM QUEIJO DE COALHO ARTESANAL DO BIOMA
CAATINGA**

Diversidade de Bactérias Ácido Láticas em queijo artesanal da Caatinga

Trabalho á ser submetido: REVISTA
PLOS ONE Página eletrônica:
<https://journals.plos.org/plosone/>

RESUMO: Queijos artesanais de leite cru são ecossistemas microbianos complexos que refletem o ambiente local por meio da fermentação espontânea conduzida por bactérias ácido lácticas (BAL), das práticas de processamento e da qualidade das matérias-primas. O bioma Caatinga, um ecossistema semiárido único do Nordeste brasileiro, apresenta condições ambientais e culturais distintas que podem influenciar significativamente a composição microbiana de produtos lácteos tradicionais. Este estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade de BAL em queijos de coalho artesanais, um queijo tradicional brasileiro produzido na região da Caatinga, por meio da análise metataxonômica do gene 16S rRNA. Um total de 32 amostras provenientes de diferentes unidades produtoras foi sequenciado na plataforma Illumina MiSeq (região V3–V4), e a identificação taxonômica foi realizada utilizando o banco de dados NeoRef. *Lactococcus* spp. foram predominantes, seguidos por *Streptococcus* spp. e *Leuconostoc* spp., confirmando o papel central das BAL como principais agentes fermentativos. Esses gêneros estão associados a funções tecnológicas e sensoriais essenciais, como acidificação, modulação da textura, formação de compostos de sabor e atividade antimicrobiana, que constituem fatores fundamentais para o desenvolvimento, segurança e preservação do produto. Assinaturas microbianas distintas foram observadas entre os locais de produção, sugerindo que as condições ambientais, a composição do leite e as práticas artesanais moldam o terroir microbiano desses queijos. Este estudo fornece o primeiro panorama metataxonômico da microbiota de queijos de coalho produzidos na região do Seridó, no estado do Rio Grande do Norte, destacando sua riqueza microbiana e potencial biotecnológico, além de apoiar sua valorização e o desenvolvimento sustentável da produção regional de queijos.

PALAVRAS-CHAVE: Análise metagenômica; diversidade genética; leite cru; microbiota láctea; queijo artesanal; sequenciamento do 16S rRNA.

4.1 INTRODUÇÃO

O queijo de coalho artesanal é um produto típico da região do Seridó, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, com grande relevância econômica, cultural e gastronômica. Sua produção é caracterizada por técnicas tradicionais transmitidas de geração em geração, utilizando principalmente leite bovino cru e coalho para a coagulação, seguidos pelas etapas de corte, dessoragem, moldagem e salga da coalhada [1]. A textura firme e flexível, combinada ao sabor levemente salgado, confere ao queijo de coalho características sensoriais únicas, reconhecidas regionalmente e apreciadas em outras partes do Brasil [2].

Diferentemente de outros queijos artesanais do Seridó, como o queijo de manteiga, a coagulação do queijo de coalho depende da ação do coalho e não apenas da acidificação do leite. Apesar de sua tradição e valor cultural, ainda existem poucos estudos científicos detalhando sua composição microbiológica e tecnológica, o que limita a padronização e o controle de qualidade do produto [3]. A fabricação varia amplamente entre os produtores, refletindo diferenças nas matérias-primas, no manejo do leite e nas técnicas de processamento, sendo o produto geralmente comercializado em blocos de 0,5 a 2,0 kg [4].

Estudos anteriores indicam que a composição dos queijos artesanais do Nordeste varia significativamente quanto aos teores de proteína, gordura e umidade, destacando a necessidade de pesquisas que caracterizem e padronizem a tecnologia de fabricação sem comprometer as propriedades tradicionais do queijo de coalho [2].

Nos últimos anos, tem havido crescente interesse por parte dos governos estaduais, produtores rurais, órgãos de inspeção sanitária e instituições de pesquisa em regulamentar e incentivar a produção de queijos artesanais no Seridó Potiguar (região do estado do Rio Grande do Norte). As análises moleculares e os métodos de produção são essenciais para diagnósticos precisos do sistema produtivo, subsidiando políticas públicas, promovendo programas de certificação e fortalecendo a identidade territorial da região [3].

Há também um interesse crescente de setores ligados à produção artesanal, instituições de pesquisa e ensino, e organizações de apoio em fomentar a produção de queijos artesanais na região do Seridó. Nesse contexto, o presente estudo busca contribuir com essa demanda por meio da análise molecular das bactérias ácido lácticas (BAL) presentes em queijos de coalho artesanais produzidos no semiárido brasileiro, utilizando análises genéticas e identificação taxonômica baseadas no sequenciamento do gene 16S rRNA, demonstrando assim a riqueza e diversidade da microbiota responsável pelas características tradicionais e pela identidade regional do produto.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado na região do Seridó, no estado do Rio Grande do Norte, parte do bioma Caatinga, caracterizado por clima semiárido, baixa pluviosidade e vegetação adaptada à escassez de água. Essa região integra a bacia leiteira do Rio Grande do Norte (Brasil), reconhecida pela forte presença da agricultura familiar e pela produção de queijos artesanais, como o queijo de coalho e o queijo de manteiga, que constituem a base da identidade sociocultural e econômica local [5]. A escolha dessa área de estudo justifica-se pela relevância da pecuária leiteira e da produção de queijos como estratégias de adaptação às condições semiáridas, bem como pelo papel que desempenham no fortalecimento da economia regional e na preservação dos saberes tradicionais associados à cultura alimentar do estado.

4.2.1 Coleta e preparo das amostras de queijo de coalho artesanal

Os queijos de coalho utilizados no estudo foram adquiridos de forma aleatória, sendo comercializados em peças de aproximadamente 500 g, embaladas a vácuo e devidamente identificadas. Como critério de seleção, foram coletados apenas queijos artesanais. As amostras de queijo foram obtidas em duplicata, provenientes de diferentes lotes, totalizando 32 unidades. Os queijos foram adquiridos em oito municípios pertencentes ao Seridó do Rio Grande do Norte (Figura 1), entre fevereiro e junho de 2024.

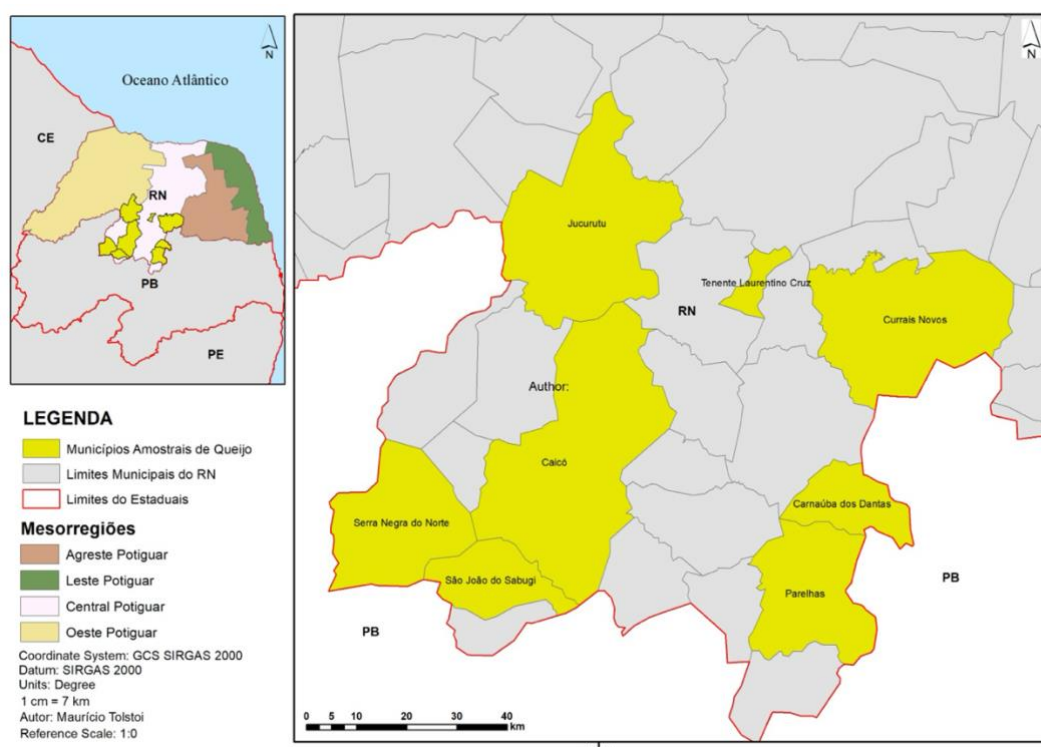


Figura 2. Mapa do estado do Rio Grande do Norte, Brasil, destacando os municípios da região do Seridó onde foram obtidas as amostras de queijo artesanal.

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Qualidade do Leite da UFRN (LABOLEITE/UFRN) para preparo e análise microbiológica molecular. A bancada de trabalho foi inicialmente higienizada com álcool 70%, e a superfície externa de cada peça de queijo também foi desinfetada com o mesmo sanitizante. As embalagens foram abertas de forma asséptica, utilizando luvas e instrumentos estéreis.

Cada unidade amostral foi macerada individualmente com o auxílio de colheres previamente esterilizadas e, em seguida, homogeneizada, sendo retiradas alíquotas de 100 g, acondicionadas em sacos plásticos a vácuo e devidamente identificadas. As amostras provenientes de uma mesma microrregião foram agrupadas em um pool para garantir a representatividade, conforme metodologia previamente estabelecida. Após a pesagem, as alíquotas foram armazenadas sob refrigeração a 12 °C em caixas isotérmicas com gelo reciclável e transportadas por via aérea para a empresa Neoprospecta Microbiome Technologies (Florianópolis/SC), seguindo os protocolos de biossegurança e conservação das amostras.

Os parâmetros físico-químicos foram avaliados simultaneamente, incluindo umidade, pH, matéria seca (MS), minerais totais na matéria seca (MM-MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta na matéria seca (PB-MS) e teor total de gordura. Todas as análises foram realizadas de acordo com os métodos recomendados pela AOAC – Official Methods of Analysis, 22^a edição (2023), e pelos Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal – MAPA, 1^a edição (2022) [6].

4.2.2 Composição físico-química das amostras de queijo

As análises físico-químicas das amostras de queijo seguiram metodologias oficiais, sendo realizadas em triplicata, conforme os procedimentos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) [7], com determinação de pH, acidez titulável total e umidade. Os lipídios foram quantificados pelo método de Gerber para composição centesimal dos queijos, conforme descrito no Regulamento nº 68 [6], e as proteínas foram determinadas de acordo com o método Kjeldahl, utilizando-se um fator de conversão de 6,38 após a análise do nitrogênio total [8].

4.2.3 Determinação do pH e acidez titulável

Um medidor digital (Lucadema, São José do Rio Preto-SP) foi utilizado para as medições de pH, inserindo-se o eletrodo diretamente nas amostras (20 g). O equipamento foi calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. A acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N até a mudança de cor do indicador fenolftaleína, utilizando 10 g de cada amostra, sendo expressa em percentual (%) de ácido láctico [8].

4.2.4 Determinação da umidade

A umidade foi obtida pesando-se 3 g de cada amostra em placas de alumínio (10 cm de diâmetro) e secando-as em estufa MOC63 (Shimadzu) a 160 °C até atingir massa constante. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.2.5 Determinação do teor de gordura

O teor de gordura foi obtido pelo método de Gerber, utilizando amostras de 10 g, homogeneizadas com ácido sulfúrico e álcool isoamílico, seguidas de centrifugação e leitura volumétrica. Os resultados foram expressos em percentual (%) de gordura.

4.2.6 Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelos métodos Kjeldahl nº 991.20 e nº 991.23 [8], abrangendo as etapas de digestão, destilação e titulação. A porcentagem de proteína foi calculada pela seguinte equação:

$$P (\%) = \frac{K \times V \times \text{Fator}}{P}$$

Em que:

Fc = fator de correção da solução de ácido clorídrico;

V = volume de ácido clorídrico utilizado na titulação (mL);

Fator = conversão de nitrogênio em proteína;

P = massa da amostra (g).

Os resultados foram tabulados e expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) de todas as amostras, calculados a partir da soma dos valores individuais de cada parâmetro dividida pelo número total de observações ($n = 32$), assegurando maior representatividade para cada variável analisada.

4.3 Extração de DNA e caracterização molecular pelo gene 16S rRNA das BAL

As amostras de queijo foram analisadas por meio do sequenciamento da região V3–V4 do gene 16S rRNA para caracterização da composição bacteriana. O sequenciamento foi realizado pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil), utilizando as plataformas Illumina MiSeq (formato single-end) e NextSeq 1000/2000™ (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA), com o kit iSeq 100 il V2 300-Cycle. Foram utilizados 25 g de cada amostra em duplicata, submetidos à extração de DNA pelo método de esferas magnéticas, conforme protocolo interno. A amplificação da região-alvo foi realizada por PCR, utilizando os primers 341F e 806R (Tabela 1). Um controle negativo (NEC) foi incluído durante as etapas de preparação das bibliotecas (PCR1 e PCR2). O fluxo metodológico, desde a extração do DNA até o sequenciamento e a análise bioinformática, está representado na Figura 2.

Table 1. Sequências de primers utilizadas nos ensaios para amplificação da região V3–V4 do gene 16S rRNA para identificação genômica de bactérias ácido láticas em queijo.

PRIMER	SEQUENCE 5'–3'
--------	----------------

Bakt_341 FW

CCTACGGGNGGWGCWGCAG

Bakt_806 RV

GGACTACHVGGGTWTCTAAT

159

Etapas do processo de extração, amplificação e sequenciamento de alto desempenho do gene 16S rRNA para análise de Bactérias ácido láticas.

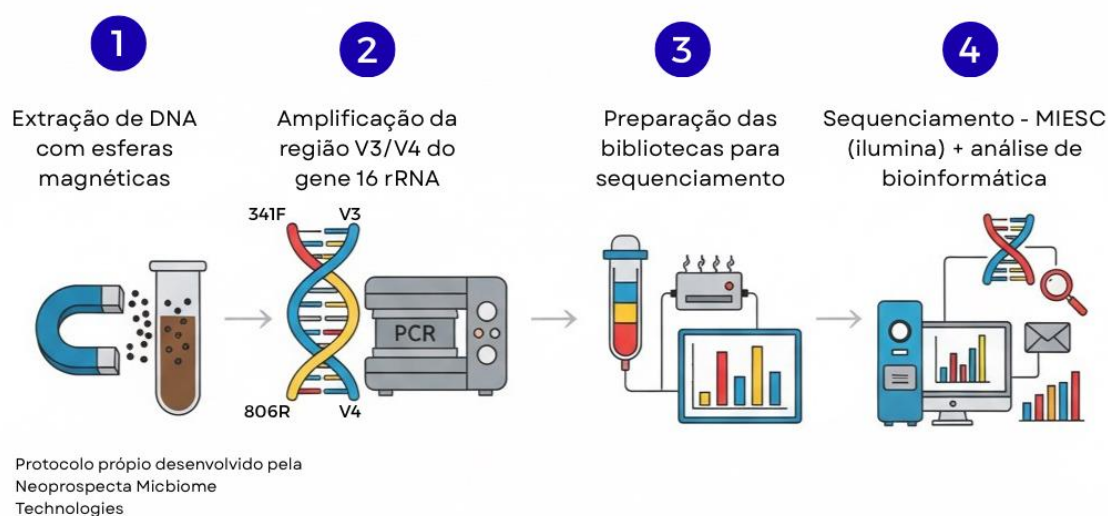


Figura 3. Fluxo metodológico do sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA bacteriano, incluindo extração de DNA, amplificação e análise bioinformática. Protocolo desenvolvido pela Neoprospecta Microbiome Technologies. Fonte: elaborado pela autora (2025).

As sequências geradas foram obtidas no formato FASTQ e processadas na plataforma QIIME2. As leituras passaram por junção de pares, filtragem por tamanho (>240 pb), avaliação de qualidade (PHRED > 30) e desduplicação com a ferramenta VSEARCH. As variantes de sequência de amplicons (ASVs) foram determinadas por agrupamento com 99% de similaridade, e os dados foram normalizados com base no menor número de sequências por amostra. As sequências que atenderam aos critérios de qualidade e apresentaram 100% de identidade foram agrupadas em clusters e submetidas à identificação taxonômica utilizando o banco de dados NeoRef (Neoprospecta Microbiome Technologies, Brasil), validado por especialistas da equipe técnica.

A aplicação do banco de dados curado garantiu uma atribuição taxonômica precisa, permitindo avaliar a diversidade e a composição da microbiota, bem como identificar as principais bactérias ácido lácticas envolvidas na produção artesanal dos queijos de coalho. Os resultados a seguir apresentam a distribuição, predominância e relevância dessas comunidades microbianas na composição do queijo artesanal estudado.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Propriedades físico-químicas das amostras de queijo de coalho artesanal da região do Seridó, estado do Rio Grande do Norte

A caracterização físico-química das amostras de queijo de coalho revelou os valores médios descritos na Tabela 2. Os resultados obtidos indicaram um teor de umidade médio de 43,51%, variando entre 41,62% e 44,77%, com baixo desvio-padrão (1,45). Esses resultados estão dentro da faixa descrita para queijos de coalho artesanais, cujo teor de umidade normalmente varia entre 40% e 55% [9]. Estudos realizados com queijos comercializados no Nordeste também relataram valores semelhantes, entre 45,62% e 54,71%, demonstrando que o teor de umidade observado neste estudo é coerente com a literatura [10]. Essa homogeneidade pode indicar certo grau de padronização durante a produção artesanal, mesmo em processos com menor controle tecnológico.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos médios das análises do queijo de coalho artesanal

Parâmetro	Média $\pm$ DP	Min - Max
Umidade (%)	43.56 $\pm$ 2.36	38.92–48.27
pH	6.32 $\pm$ 0.40	5.52–6.87
Gordura (%)	25.03 $\pm$ 3.38	18.50–29.50
Proteína (%)	30.77 $\pm$ 3.59	26.02–37.75
Cinzas (%)	4.58 $\pm$ 0.53	3.56–5.58

Carboidratos (%)	3.50 ± 1.29	1.10–5.40
Lipídios (kcal/100 g)	332 ± 18	295–361

194 Carboidratos estimados por diferença após normalização proporcional dos sólidos; Min.:
195 Mínimo; Max.: Máximo.

196 A composição centesimal dos queijos de coalho artesanais analisados neste estudo
197 reflete as características físico-químicas tipicamente associadas a queijos frescos, de
198 coagulação enzimática, produzidos com leite cru. O teor de umidade (média de 43,56%)
199 enquadra o produto na categoria de queijos semiduros, em consonância com relatos
200 anteriores para o queijo de coalho e outros queijos artesanais brasileiros, que geralmente
201 variam entre 40% e 55% [9,10]. Essa homogeneidade pode indicar certo nível de
202 padronização durante a produção artesanal, mesmo em processos com menor controle
203 tecnológico.

204 Os valores de pH observados (5,52–6,87; média de 6,32), conforme relatado em
205 estudos que indicam valores entre 5,5 e 6,5 para queijos frescos de coalho [11], sugerem
206 acidificação incompleta, possivelmente devido ao uso limitado de culturas iniciadoras ou ao
207 curto tempo de maturação característico desses produtos [12]. Essa condição pode
208 influenciar a microbiota presente, a textura e até a estabilidade microbiológica do queijo,
209 reforçando a relevância de identificar as bactérias ácido lácticas naturais que contribuem para
210 a fermentação nesses sistemas. Essa dispersão reflete a heterogeneidade da produção
211 artesanal já relatada em outros estudos, podendo estar relacionada a fatores como diferenças
212 no teor inicial de gordura do leite, variações no processo de dessoragem e no manejo durante
213 a coagulação [13]. Essa instabilidade reforça que a falta de padronização das matérias-primas
214 e do processamento impacta diretamente a composição centesimal do produto.

215 Os teores de gordura (25,03%) e proteína (30,77%) indicam uma matriz de alta
216 concentração de sólidos e densidade nutricional significativa, característica comum de
217 queijos produzidos em condições tradicionais e de pequena escala. Os valores de gordura

total são compatíveis com a classificação de queijos de média gordura, conforme estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade [14].

Estudos recentes apontam teores semelhantes, como descrito por [15], que identificaram valores médios entre 25% e 29% em queijos de coalho artesanais da região Nordeste, atribuindo sua variabilidade à composição do leite cru utilizado, bem como às diferenças nos processos de dessoragem e prensagem. A variabilidade no teor lipídico dos queijos artesanais está diretamente associada ao uso de leite cru não padronizado, à desnatagem parcial e ao método de prensagem, fatores que podem explicar a variação registrada nas amostras analisadas [16].

O teor médio de proteína encontrado neste estudo foi superior ao relatado em pesquisas realizadas com queijos de coalho de produção industrial, nos quais os teores variaram entre 18% e 25% [17].

O teor de cinzas (4,58%, em base úmida) manteve-se dentro da faixa esperada para queijos elaborados com leite cru e confirma a contribuição mineral característica de produtos oriundos de regiões semiáridas, onde a dieta animal e a disponibilidade de água podem influenciar a composição do leite.

O menor teor de carboidratos observado neste estudo (3,5%) é compatível com a conversão quase completa da lactose durante a fermentação inicial. Quando comparado aos valores de 5% a 7% comumente relatados para queijos de coalho de diferentes microrregiões do Nordeste, esse resultado pode ser atribuído aos maiores teores de sólidos e proteínas das amostras, que reduzem proporcionalmente a fração residual de carboidratos [18]. Além disso, a fermentação espontânea conduzida por bactérias ácido lácticas nativas em queijos de leite cru pode resultar em uma utilização extensiva da lactose nas fases iniciais de armazenamento, levando a menores teores remanescentes de carboidratos. Diferenças metodológicas também podem contribuir para a discrepância, uma vez que alguns estudos publicados não corrigem erros de fechamento analítico. No presente trabalho, foi aplicada a

normalização proporcional dos sólidos, gerando uma estimativa mais conservadora e internamente consistente do teor de carboidratos.

O valor energético estimado (332 kcal/100 g) está de acordo com os dados relatados para queijos semiduros no Brasil e em outros países [19,20]. A variabilidade observada entre as amostras reflete a heterogeneidade das matérias-primas, das práticas artesanais e das condições ambientais, típicas do sistema de produção baseado na Caatinga. Essa variabilidade evidencia a importância de estabelecer bases composicionais que subsidiem o controle de qualidade, a rastreabilidade e futuros marcos regulatórios para os queijos artesanais no Brasil [13].

De modo geral, a composição indica um produto nutricionalmente denso, com considerável variabilidade entre as unidades de produção artesanal. Esse perfil físico-químico auxilia na caracterização dos queijos de coalho do bioma Caatinga e complementa os achados microbiológicos deste estudo. A heterogeneidade observada entre as amostras reflete a identidade regional da produção artesanal, mas também pode influenciar a qualidade e a estabilidade do produto. Esses resultados ressaltam a importância da adoção de boas práticas de fabricação que preservem os atributos tradicionais do queijo, ao mesmo tempo em que favoreçam maior padronização do processo, consistência na qualidade e futuros avanços tecnológicos.

4.4.2 Composição taxonômica da microbiota do queijo de coalho do Seridó do Rio Grande do Norte

A análise metagenômica das amostras de queijo de coalho artesanal do Seridó, no Rio Grande do Norte, revelou uma microbiota rica e taxonomicamente diversa, composta por 69 espécies bacterianas distribuídas em 25 gêneros, 11 famílias, 4 ordens, 2 classes e 2 filos, todos pertencentes ao Reino Bacteria (Fig. 4). Entre os filos identificados, Firmicutes e Proteobacteria foram os únicos detectados e predominaram na comunidade bacteriana do

produto. Essa predominância é consistente com os perfis microbiológicos já relatados em produtos lácteos fermentados elaborados com leite cru, nos quais a microbiota indígena desempenha um papel central na fermentação, no desenvolvimento sensorial e na estabilidade do alimento [21, 22]. Resultados semelhantes foram observados em queijos artesanais de outras regiões do Nordeste brasileiro e da Europa, evidenciando padrões comuns em produtos lácteos produzidos com leite cru [23].

Utilizando técnicas de cultivo e sequenciamento genético, [24] demonstraram que a microbiota da pele do úbere de vacas compartilha filos também detectados neste estudo, como Firmicutes e Proteobacteria. Esses achados sugerem que a pele do úbere pode atuar como uma importante fonte de microrganismos para o leite cru, influenciando diretamente a composição microbiana da matéria-prima utilizada na fabricação de queijos artesanais.

Gêneros tecnologicamente relevantes, como *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*, destacam-se no filo Firmicutes; *Lactococcus* spp. desempenha um papel essencial na acidificação inicial do leite, *Lactobacillus* spp. contribui para o amadurecimento e o desenvolvimento das características sensoriais, e *Enterococcus* spp. participa na formação do perfil aromático e na estabilidade do queijo, reforçando a importância da microbiota láctica na identidade e na qualidade tecnológica do queijo de coalho artesanal. Esses gêneros exercem funções adicionais, incluindo a produção de bacteriocinas e a exclusão competitiva de microrganismos oportunistas, modulando a composição microbiana do produto final [25]. Essas bactérias ácido lácticas também participam da síntese de ácidos orgânicos, aminoácidos aromáticos e exopolissacarídeos, influenciando diretamente a textura, o sabor, a segurança alimentar e conferindo um potencial efeito probiótico. Embora o filo *Proteobacteria* inclua microrganismos de interesse tecnológico limitado, algumas espécies possuem implicações para a saúde, frequentemente associadas à contaminação ambiental, falhas de higiene ou defeitos de fabricação [24].

A alta diversidade microbiana observada indica uma comunidade capaz de manter a fermentação espontânea e garantir a estabilidade do produto, mesmo diante de variações no leite cru ou nas condições de produção. Essa diversidade é favorecida pela natureza artesanal do processo, que envolve o uso de leite cru, utensílios não padronizados, fermentação espontânea e ausência de culturas iniciadoras comerciais, além de fatores extrínsecos como o clima semiárido, o manejo animal, a composição do solo e a vegetação da Caatinga [26]. Esse conjunto de elementos sustenta o conceito de “terroir microbiológico”, definido como a assinatura microbiana única resultante da interação entre práticas tradicionais, ambiente e matérias-primas [27].

Além disso, o conhecimento detalhado da microbiota por meio de abordagens metagenômicas oferece oportunidades de inovação tecnológica, incluindo a otimização dos processos artesanais, o desenvolvimento de culturas iniciadoras autóctones e o fortalecimento da segurança alimentar, sem comprometer as características sensoriais que tornam o queijo de coalho do Seridó um produto único e valorizado.

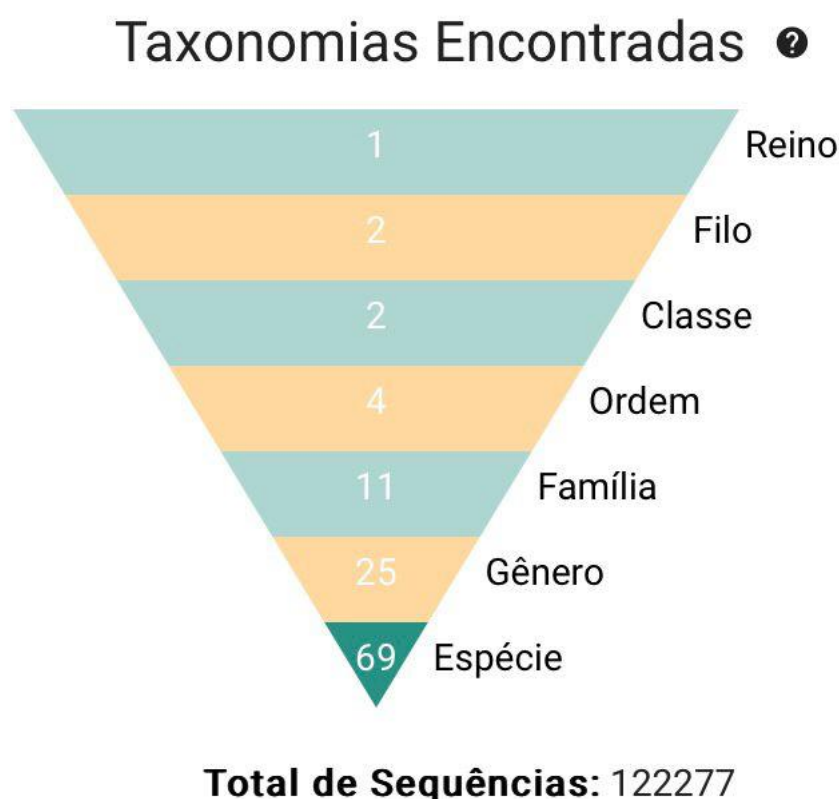


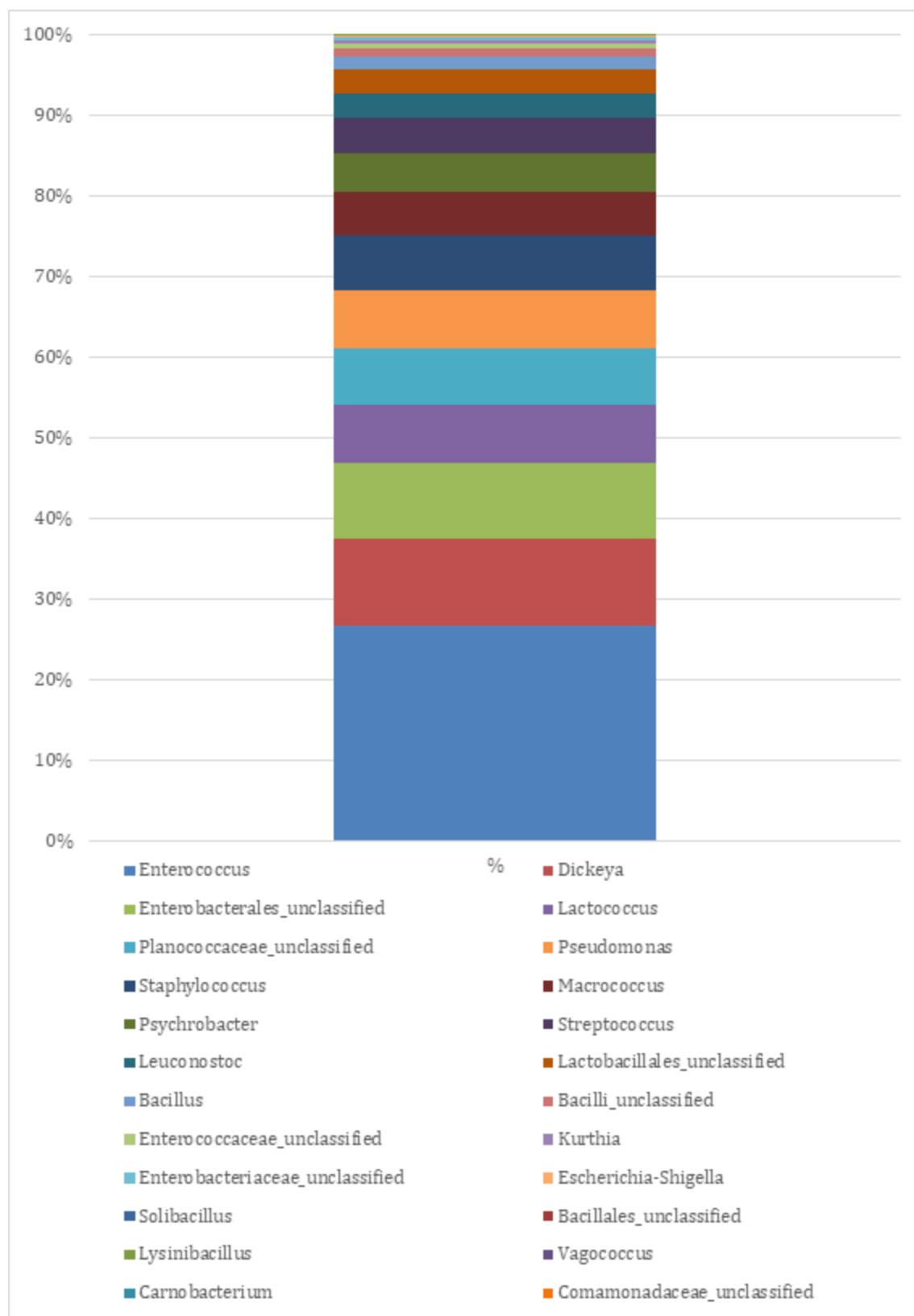
Figura 4. Distribuição taxonômica das sequências identificadas em amostras de queijo de coalho artesanal da região do Seridó, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

4.4.3 Caracterização e diversidade microbiológica do queijo de coalho artesanal da região do Seridó, estado do Rio Grande do Norte

Os resultados revelaram uma comunidade microbiana altamente diversa (Fig. 4), composta principalmente por bactérias ácido lácticas (BAL), um grupo funcionalmente associado à fermentação do leite cru e à manutenção da segurança microbiológica do produto [28]. Essa diversidade é característica de sistemas de fermentação espontânea e é diretamente influenciada pela ausência de pasteurização, pela heterogeneidade das práticas entre os produtores e pelo uso recorrente de utensílios e superfícies reutilizados, que favorecem a formação de biofilmes e o estabelecimento de um microbioma autóctone adaptado ao ambiente de produção artesanal [29].

322

323



324

325

Figura 5. Abundância relativa (%) dos gêneros bacterianos detectados em queijo de coalho artesanal da região do Seridó, estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

4.4.4 Bactérias lácticas predominantes

a) *Enterococcus* spp.

A análise revelou que o gênero *Enterococcus* representou cerca de 25% (Fig. 4) do total da comunidade bacteriana nas amostras de queijo de coalho artesanal avaliadas. Esse achado destaca *Enterococcus* como o táxon dominante do microbioma do produto. A alta prevalência desse grupo é consistente com estudos anteriores realizados em queijos artesanais produzidos com leite cru, os quais demonstram a recorrente dominância de *Enterococcus* em produtos lácteos não pasteurizados [30].

Essa predominância pode ser atribuída à adaptabilidade fisiológica dessas bactérias, que toleram ampla faixa de pH (4,5 a 9,6), altas concentrações de NaCl (até 6,5%) e resistem a temperaturas entre 10 °C e 45 °C, constituindo, assim, características compatíveis com as condições frequentemente observadas durante a produção, maturação e armazenamento de queijos artesanais [31]. A rusticidade do processo artesanal, associada ao uso de leite cru e à ausência de fermentos comerciais definidos, favorece a seleção natural de microrganismos como *Enterococcus*, que encontram um ambiente propício à colonização e multiplicação nesses produtos [32].

Do ponto de vista funcional, *Enterococcus* pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) capazes de fermentar carboidratos por meio da produção de ácido lático, o que contribui diretamente para a acidificação do leite, coagulação da caseína e inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis durante o processo fermentativo [33]. Além disso, muitas cepas possuem a capacidade de produzir bacteriocinas, como enterocina A e enterocina B peptídeos antimicrobianos eficazes contra patógenos alimentares relevantes, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* [34].

Outro aspecto relevante é o potencial probiótico de determinadas cepas de *Enterococcus* isoladas de produtos artesanais, especialmente *E. faecium* e *E. durans*, que

apresentaram resistência a condições gastrointestinais simuladas, adesão a células epiteliais intestinais e atividade antimicrobiana in vitro [35]. Embora o uso de *Enterococcus* como probióticos seja controverso devido à possibilidade de transferência de genes de resistência a antibióticos, estudos genômicos recentes têm possibilitado diferenciar cepas tecnológicas seguras daquelas com potencial patogênico, permitindo sua aplicação na indústria de alimentos mediante avaliação criteriosa [36].

A presença dominante de *Enterococcus* neste estudo também está em consonância com padrões observados em outros queijos artesanais brasileiros, como o queijo Canastra (MG), o queijo do Marajó (PA) e outras variedades de queijo de coalho do Nordeste. O gênero *Enterococcus* aparece como componente central do microbioma em todos esses casos, sendo influenciado por fatores como a microbiota do leite cru, as condições de processamento, os utensílios e o ambiente de maturação [37]. Essas evidências sugerem a existência de um “terroir microbiológico”, no qual *Enterococcus* atua como marcador ecológico dos queijos artesanais brasileiros. Embora sua predominância indique autenticidade e rusticidade do processo artesanal, é importante salientar que o gênero *Enterococcus* também inclui espécies oportunistas com histórico de infecções nosocomiais, como *E. faecalis* e *E. faecium* multirresistentes [38].

Além da caracterização por gêneros, a análise identificou espécies específicas com reconhecido potencial tecnológico para a produção de queijos artesanais. Entre elas, *Enterococcus durans* e *E. faecium* destacaram-se pela relevância na acidificação e pela produção de bacteriocinas em algumas cepas, favorecendo tanto a fermentação quanto a segurança microbiológica [39]. Além de *Lactococcus lactis*, do gênero *Lactococcus*, também foi detectada *L. garvieae*, cuja aplicação é controversa por incluir cepas oportunistas, mas que também apresenta linhagens de interesse biotecnológico [31]. *Leuconostoc mesenteroides* é especialmente valorizada pela geração de CO₂ responsável pela formação

dos “olhos” e pela produção de metabólitos aromáticos, como o diacetil, que contribuem para o sabor característico dos queijos artesanais [40].

Outras espécies, como *Streptococcus equinus* e *Staphylococcus* não patogênicos (*S. equorum*, *S. xylosus*, *S. vitulinus* e *S. succinus*), também podem atuar em etapas específicas da fermentação e maturação, contribuindo para a complexidade de aromas e sabores por meio de atividades lipolíticas e proteolíticas [27]. Por fim, a detecção de *Vagococcus martis* ainda pouco explorada em estudos sobre queijos e produtos lácteos brasileiros sugere um papel emergente na fermentação espontânea, reforçando a diversidade e o potencial funcional da microbiota autóctone [41].

b) *Lactococcus* spp.

Outro gênero com abundância significativa foi *Lactococcus*, amplamente reconhecido como um dos pilares da fermentação láctea tradicional e industrial. Trata-se de uma das bactérias ácido lácticas (BAL) mais desejáveis na produção de queijos, especialmente nas etapas iniciais da fermentação, devido à sua elevada capacidade de acidificar o leite por meio da produção eficiente de ácido láctico [42]. Essa acidificação promove a coagulação da caseína, inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis e estabelece um ambiente favorável ao desenvolvimento de outras culturas microbianas benéficas [43]. Além de seu papel fundamental na acidificação, espécies como *Lactococcus lactis* destacam-se pela produção de compostos voláteis e aromáticos como diacetil, acetaldeído e acetoina que conferem ao queijo características sensoriais distintas, como aroma amanteigado e notas frescas, levemente cítricas. Esses metabólitos desempenham um papel essencial na construção do perfil sensorial típico dos queijos artesanais, influenciando diretamente o sabor, o aroma e a textura do produto final [44].

Do ponto de vista tecnológico, *L. lactis* também apresenta atributos relevantes, como a produção de bacteriocinas (por exemplo, nisina), que possuem atividade antimicrobiana

401 contra patógenos e microrganismos deteriorantes, contribuindo para a segurança
402 microbiológica e estabilidade do queijo durante o armazenamento. Essa multifuncionalidade
403 biotecnológica torna o gênero *Lactococcus* um aliado estratégico na produção de queijos de
404 qualidade superior, especialmente em sistemas artesanais que dependem da microbiota
405 natural do leite cru e do ambiente de produção [42].

406
407 c) *Leuconostoc* spp.

408 O gênero *Leuconostoc* também compõe uma microbiota rica e é reconhecido como
409 um componente funcional e desejável da microbiota de queijos artesanais, especialmente
410 aqueles produzidos por fermentação espontânea com leite cru. Os membros desse gênero,
411 particularmente *Leuconostoc mesenteroides*, desempenham papel essencial na formação de
412 compostos aromáticos e na produção de dióxido de carbono (CO₂), o que contribui para a
413 leveza da textura e o desenvolvimento de “olhaduras” (cavidades) em alguns tipos de queijo.
414 Além disso, esse gênero participa ativamente da conversão de citrato em diacetil e acetoína,
415 compostos voláteis responsáveis por agradáveis notas sensoriais amanteigadas [43]. Sua
416 presença é recorrente em queijos produzidos por fermentação natural e é considerada um
417 marcador de identidade microbiana regional.

418 Estudos realizados com queijos artesanais da Serra da Canastra (Minas Gerais)
419 também identificaram *Leuconostoc* como um dos principais gêneros da microbiota
420 dominante, especialmente em produtos com maior tempo de maturação e sob condições
421 ambientais favoráveis à fermentação heterolática [34, 44]. De forma semelhante, análises
422 metagenômicas de queijos Minas Artesanal da região do Serro mostraram presença
423 consistente de *Leuconostoc*, associando sua atuação à formação de aroma e à complexidade
424 do perfil sensorial [45]. No acompanhamento do queijo de coalho artesanal do Seridó
425 Potiguar, a identificação de *Leuconostoc* reforça a importância do leite cru e das práticas

tradicionais na manutenção de uma microbiota indígena benéfica, que contribui para a identidade e singularidade do produto final [46].

Entretanto, a abundância relativa de *Leuconostoc* pode variar consideravelmente entre os lotes, dependendo de fatores como temperatura, acidez, teor de sal e competição microbiana. Apesar de seu papel positivo, sua sobrevivência é sensível a ambientes muito ácidos ou salinos, o que pode favorecer a predominância de gêneros mais tolerantes, como *Enterococcus* [43].

d) *Streptococcus* spp.

A presença do gênero *Streptococcus* identificada nas amostras de queijo de coalho artesanal da região do Seridó, no estado do Rio Grande do Norte, destaca a relevância da fermentação natural como processo central na formação da microbiota láctica indígena. Entre as espécies mais conhecidas, *Streptococcus thermophilus* se destaca por sua aplicação consolidada em culturas iniciadoras comerciais, especialmente na produção de iogurtes e queijos industriais, como Mozzarella e Cheddar. Trata-se de uma bactéria ácido láctica termofílica e homofermentativa, com alta capacidade de acidificação do leite e produção de exopolissacarídeos (EPS), atuando em sinergia com *Lactobacillus delbrueckii subsp.*, contribuindo para a textura e estabilidade do produto final [47].

Entretanto, a presença de *Streptococcus* em queijos artesanais produzidos com leite cru, como os das regiões do Seridó (RN), Serro (MG) e Canastra (MG), pode refletir uma origem ambiental ou do próprio leite, uma vez que o gênero também inclui espécies comensais ou oportunistas provenientes dos tratos mamário e oral de ruminantes. Estudos metagenômicos realizados com queijos Minas Artesanal revelaram frequências variáveis de *S. thermophilus*, frequentemente ausente ou presente em pequenas quantidades, indicando que sua ocorrência depende fortemente do microbioma original do leite cru, das condições de processamento e da microbiota competitiva do ambiente de produção [48].

A identificação de *Streptococcus* no queijo de coalho artesanal do Seridó reforça a influência das práticas tradicionais e da ausência de cultura iniciadora na formação de um perfil microbiano espontâneo e regionalizado. A variabilidade intra e inter-regional observada em estudos brasileiros sugere que a permanência e a atuação de *S. thermophilus* e outras espécies do gênero são altamente contextuais [49]. Além disso, sua presença pode exercer efeitos benéficos sobre a fermentação e a formação de ácido lático, especialmente nas etapas iniciais de coagulação, embora seu papel seja frequentemente secundário em relação a gêneros mais dominantes, como *Lactococcus* e *Enterococcus*, nos queijos artesanais do Nordeste [45].

4.4.5 Microrganismos oportunistas e contaminantes ambientais

A predominância de bactérias ácido lácticas em queijos artesanais reconhecidas por sua diversidade e por seu potencial tecnológico, bioprotetor e de segurança alimentar [50] contrasta com a detecção de microrganismos tipicamente associados à contaminação ambiental ou a riscos à saúde. *Planococcaceae*, comum em solo, poeira e superfícies industriais, foi detectada em proporções significativas. Sua ocorrência (já registrada em queijos artesanais europeus e latino-americanos) é geralmente relacionada a falhas nas boas práticas de fabricação (BPF) e à ausência de controle ambiental [51, 33].

Staphylococcus merece destaque entre os gêneros de interesse sanitário, pois inclui espécies como *S. aureus*, produtoras de enterotoxinas, frequentemente associadas ao manuseio inadequado e à má higienização de utensílios [52]. *Psychrobacter*, embora não patogênico, pode crescer sob refrigeração e causar alterações sensoriais indesejáveis. *Macroccoccus*, comensal da pele humana ou da mucosa de outros animais, indica possível contaminação cruzada durante a ordenha e a produção do queijo coalho [43]. A detecção de *Bacillus* reflete a presença de esporos termo-resistentes, potencialmente toxigênicos e capazes de causar defeitos tecnológicos, como amolecimento da casca e formação de gases. Sua ocorrência está associada à contaminação ambiental e ao manuseio pós-processamento, sendo consistente com registros em outros queijos artesanais brasileiros [31, 53].

Outros gêneros identificados incluem *Kurthia*, *Solibacillus* e *Lysinibacillus*, contaminantes ambientais sem função tecnológica definida; *Comamonadaceae*, associada à deterioração e formação de biofilmes; e representantes de *Bacillales* com espécies toxigênicas [54]. Do ponto de vista sanitário, merece atenção a detecção de *Dickeya* (*Pectobacteriaceae*), um gênero descrito como patógeno de plantas, mas ocasionalmente relatado em alimentos e ambientes de processamento [55]. Sua presença no queijo de coalho sugere contaminação ambiental ou contato indireto com resíduos vegetais, possivelmente associados às etapas de ordenha, manipulação do leite e processamento do queijo [56]. Além disso, estudos recentes indicam que espécies de *Dickeya* têm capacidade de formar biofilmes e carregar determinantes de virulência e resistência, o que reforça a importância do monitoramento e da aplicação rigorosa de BPF em sistemas artesanais [57].

A detecção do gênero *Enterobacter* e do grupo *Escherichia-Shigella* é indicativa de contaminação fecal, evidenciando possíveis falhas de higiene e sanitização durante a ordenha, o manuseio ou o armazenamento. Esse achado é relevante na produção de queijo de coalho artesanal, pois sugere risco de presença de cepas patogênicas, como *Escherichia coli* enteropatogênica (*E. coli*), geralmente associadas a surtos de doenças gastrointestinais transmitidas por alimentos contaminados [58].

Em um estudo que avaliou o efeito da inoculação de bactérias ácido lácticas na produção de queijo de cabra artesanal de média maturação também característico da região Nordeste do Brasil [59], os autores observaram que a inoculação de BAL teve efeito significativo sobre a microbiota avaliada, reduzindo a presença de microrganismos indesejáveis de maneira semelhante ao efeito da pasteurização. Concluíram que o uso de bactérias ácido lácticas indígenas selecionadas pode se tornar uma estratégia biotecnológica para padronizar a qualidade e a segurança de queijos de média maturação, preservando suas características artesanais sem depender exclusivamente da pasteurização convencional. Essa estratégia biotecnológica deve ser avaliada e pode representar uma alternativa para auxiliar os produtores da região do Seridó, no estado do Rio Grande do Norte.

4.5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o queijo de coalho artesanal do Seridó, no Rio Grande do Norte, abriga uma microbiota diversa, dominada por bactérias ácido lácticas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Esses microrganismos são fundamentais para a fermentação, estabilidade e características sensoriais do produto,

enquanto a presença de táxons oportunistas reforça a necessidade de boas práticas de higiene e sanidade.

A composição microbiana foi influenciada por fatores ambientais, culturais e tecnológicos, evidenciando um terroir microbiano distinto. A abordagem metataxonômica baseada no gene 16S rRNA proporcionou novos *insights* sobre a ecologia microbiana desses queijos, contribuindo para o entendimento da diversidade microbiana em sistemas lácteos tradicionais, apoiando o desenvolvimento sustentável e fortalecendo a produção regional de queijos, ao conciliar o saber artesanal com a ciência moderna.

REFERÊNCIAS

1. Nascimento ELS, et al. Microbiological profile of artisanal coalho cheese produced in the Seridó region of Rio Grande do Norte, Brazil. Food Sci Technol. 2024;44. doi: 10.5327/fst.00162%20.
2. Souza Queiroz SAV, Sales DC, Araújo EDM, Neto MP, Matos MMS, Neves JA, et al. Caracterização da produção de queijo de manteiga artesanal: contribuições para a proteção da tradição e indicação geográfica no Seridó, região semiárida brasileira. Aracê. 2025;7(5):27235-80. doi: 10.56238/arev7n5-358.
3. Oliveira L. Physical-chemical and microbiological characterisation of coalho cheese and butter produced in the Seridó Potiguar region [dissertation]. Macaíba: Federal University of Rio Grande do Norte; 2018. Available from: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/27458>.
4. Lima JMP. Evaluation of the microbiome of coalho cheese [dissertation]. Mossoró: Federal Rural University of the Semi-Arid Region; 2017. Available from: <https://repositorio.ufersa.edu.br/handle/tede/819>.
5. Brito AGM, Almeida LQD. Socio-environmental vulnerability to drought in the Seridó Potiguar, Brazil: building indicators. Society & Nature. 2023;35:e67826. doi: 10.14393/SN-v35-2023-67826x.
6. Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Official physical-chemical analytical methods for the control of milk and dairy products. Normative Instruction No. 68, 12 Dec 2006. Official Gazette of the Federative Republic of Brazil.

7. Adolfo Lutz Institute. Analytical standards of the Adolfo Lutz Institute: chemical and physical methods for food analysis. 3rd ed. São Paulo: IMESP; 2008. p. 233-4.
8. AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 16th ed. Gaithersburg, MD: AOAC Intl; 2010.
9. Pinheiro JS, Sá Júnior EM, Brito RS, Branco LCC. Yield of coalho cheese produced at different temperatures. *Rev Semiárido Visu.* 2025;13(3):234–48. doi: 10.31416/rsdv.v13i3.943.
10. Costa RS, Melo JM, Oliveira FSA. The appreciation of artisanal Coalho cheese in Seridó Potiguar: challenges and perspectives. *J Artisanal Prod.* 2019;10(1):60–75.
11. Silva EF, Silva PL, Barcelos SC, Nascimento VLV, Ramos LSN, Cavalcante AB. Physical-chemical characteristics and centesimal composition of coalho cheeses sold in cities in Ceará. *Res Soc Dev.* 2021;10(2):e46710212573.doi :10.33448/rsd-v10i2.12573.
12. Marques BQA, Regis AA, Paulino CG, Rocha Filho LKA, Pinto DS, Batista EM. Development and physical-chemical analysis of coalho cheese with added seriguela leaves (*Spondias purpurea*). *Res Soc Dev.* 2021;10(9):e19710917472. doi : 10.33448/rsd-v10i9.17472.
13. Saraiva MC, Dutra SÂ, Barroso AB. Quality control in the production of Coalho cheese in Brazil: a review. *Res Soc Dev.* 2023;12(3):e13412340534.
14. Ministério da Agricultura e Pecuária. Brazilian Inspection System for Products of Animal Origin – SISBI/POA. Brasília: MAPA; 2023. Available from: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sisbi>.

15. Costa RGB, Moreira GDM, Costa Júnior LCG, Paula JCJ, Sobral D, Magalhães FAR, Souza BM. Sensory profile of Coalho cheese made with lactic acid. *J Cândido Tostes Dairy Inst.* 2019;74(4):262–73. doi: 10.14295/2238-6416.v74i4.770.
16. Santos JL, Almeida RP, Sousa CG. Microbiological characterisation and certification of artisanal dairy products: the case of Coalho cheese. *Microb Divers Dairy Prod.* 2022;8(1):52-67.
17. Hosken BDO, Melo Pereira GV, Lima TTM, Ribeiro JB, Magalhães Júnior WCPD, Martin JGP. Underexplored potential of lactic acid bacteria associated with artisanal cheese making in Brazil: challenges and opportunities. *Fermentation.* 2023;9(5):409. doi: 10.3390/fermentation9050409.
18. Teles ARS. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” com adição de hidrocoloides e extrato de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) [dissertação]. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe; 2019.
19. Rekowsky BSD, Monteiro MLG, Silva TM, Conté-Júnior CA, Costa MPD. Semi-hard buffalo cheese: how cow's milk affects sensory acceptance? *Brazilian Journal of Food Technology.* 2022;25:e2022030. doi: 10.1590/1981-6723.03022.
20. Eugster-Meier E, Fröhlich-Wyder MT, Jakob E, Wechsler D, Morales L, Licitra G, et al. Semi-hard Cheeses. In: *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics.* 2017. p. 247-300. doi: 10.1002/9781119046165.ch3.
21. Kothe CI, Mohellibi N, Renault P. Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics. *Food Res Int.* 2022;157:111265. doi: 10.1016/j.foodres.2022.111265.
22. Han D, et al. Metagenomics profiling of the microbial community and functional differences in solid-state fermentation vinegar starter (seed Pei) from different Chinese regions. *Front Microbiol.* 2024;15. doi: 10.3389/fmicb.2024.1389737.

23. Kamimura BA, Magnani M, Luciano WA, Campagnollo FB, Pimentel TC, Alvarenga VO, et al. Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2019;18(5):1636-57. doi:10.1111/1541-4337.12486.
24. Hoque MN, Istiaq A, Clement RA, et al. Metagenomic deep sequencing reveals association of microbiome signature with functional biases in bovine mastitis. *Sci Rep*. 2019;9(1):13536. doi: 10.1038/s41598-019-49468-4.
25. Silva LF, et al. Biodiversity and succession of lactic microbiota involved in Brazilian buffalo mozzarella cheese production. *Braz J Microbiol*. 2022;53(1):303–16. doi: 10.1007/s42770-021-00629-6.
26. Aguiar SC, Lima VLA, Silva PF, Dantas Neto J, Farias MSS. Sustentabilidade da pecuária leiteira do semiárido brasileiro com base em vulnerabilidade e resiliência socioecológica. *Rev Ibero-Am Ciênc Ambient*. 2020;11(2):236–48. doi: 10.6008/CBPC2179-6858.2020.002.0025.
27. Irlinger F, et al. A comprehensive, large-scale analysis of "terroir" cheese and milk microbiota reveals profiles strongly shaped by both geographical and human factors. *ISME Commun*. 2024;4(1):ycae095. doi: 10.1093/ismeco/ycae095.
28. Pineda APA, Campos GZ, Pimentel-Filho NJ, Franco BDGM, Pinto UM. Brazilian artisanal cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. *Front Microbiol*. 2021;12:666922. doi:10.3389/fmicb.2021.666922.
29. Alshareef HA, Aly MM, Bokhari FM, Al-Seeni MN. Microbial contaminants and risk factors involved in the contamination of different types of cheese samples. *AGBIR Int J*. 2023;39(1):421–26. doi:10.35248/0970-1907.23.39.421-426.

30. Terzić-Vidojević A, Veljović K, Popović N, Tolinački M, Golić N. Enterococci from raw-milk cheeses: current knowledge on safety, technological, and probiotic concerns. *Foods*. 2021;10(11):2753. doi:10.3390/foods10112753.
31. Lima JMS, Carneiro KO, Pinto UM, Todorov SD. Bacteriocinogenic anti-listerial properties and safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Lactococcus garvieae* strains isolated from Brazilian artisanal cheesemaking environment. *J Appl Microbiol*. 2024;135(7):159. doi:10.1093/jambio/lxae159.
32. Campagnollo FB, et al. Corrigendum to “Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses”. *Food Microbiol*. 2018;76:572–574. doi: 10.1016/j.fm.2018.03.005.
33. Choi J, Lee SI, Rackerby B, et al. Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses. *J Dairy Sci*. 2020;103(5):4026–42. doi:10.3168/jds.2019-17455.
34. De Paula J, et al. Artisanal cheese microbiota from the Canastra region, Brazil: a metagenomic approach. *Food Microbiol*. 2022;102:103933.
35. Yerlikaya O, Akbulut N. Potential use of probiotic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains in Izmir Tulum cheese as adjunct culture. *J Food Sci Technol*. 2019;56(4):2175-85.
36. Magalhães EVF. Antibacterial and antibiofilm activity of *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir grains against resistant enterobacteria [dissertation]. Sobral: Federal University of Ceará; 2024. Available from: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/79922/3/2024_dis_evfmagalhaes.pdf.

37. Costa EA. Microbiological characteristics and study of the microbiota of artisanal cheeses produced with raw milk [thesis]. Viçosa: Federal University of Viçosa; 2022.
38. Chaves CRS, Salamandane A, Vieira EJP, Salamandane C. Antibiotic resistance in fermented foods chain: evaluating the risks of emergence of Enterococci as an emerging pathogen in raw milk cheese. *Int J Microbiol.* 2024;2024:1–13. doi: 10.1155/ijm/2409270.
39. Amaral GV, Dias RS, Souza MR, Santos AS, Nicoli JR, Carvalho AF. Characterization and survival of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese. *Food Sci Technol.* 2017;37(2):246-52. doi:10.1590/1678-457X.04016.
40. Ruppitsch W, Nisic A, Hyden P, et al. Genetic diversity of *Leuconostoc mesenteroides* isolates from traditional Montenegrin brine cheese. *Microorganisms.* 2021;9(8):1612. doi:10.3390/microorganisms9081612.
41. Frazilio DA, Almeida OGG, Oliveira CAF, Lee SHI, Corassin CH, Alves VF, de Martinis ECP. Metataxonomics contributes to unravel the microbiota of a Brazilian dairy. *J Dairy Res.* 2020;87(3):360-363. doi: 10.1017/S0022029920000837.
42. Coelho MC, Malcata FX, Silva CCG. Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: from starter cultures to probiotic functions. *Foods.* 2022;11(15):2276. doi:10.3390/foods11152276.
43. Zhang Y, et al. Advances in metagenomic analysis of microbial communities in dairy fermentations. *Microorganisms.* 2021;11(1):45.

44. Dapkevicius MLE, Sgardioli B, Câmara SPA, Poeta P, Malcata FX. Current trends of Enterococci in dairy products: a comprehensive review of their multiple roles. *Foods*. 2021;10(4):821. doi: 10.3390/foods1004082.
45. Santos AS, Dias RS, Amaral GV, Carvalho AF, Souza MR. Lactic acid bacteria in Brazilian artisanal cheeses: diversity, technological properties and safety aspects. *Food Res Int*. 2020;137:109–18. doi:10.1016/j.foodres.2020.109618.
46. Souza JA, Nascimento AM, Silva LF, Silva DP, Almeida MA, Silva AL. Microbiological profile of artisanal coalho cheese produced in the Seridó region of Rio Grande do Norte, Brazil. *Food Sci Technol J*. 2025;45(1):162-168. Available from: <https://fstjournal.com.br/revista/article/view/162>.
47. Jurášková D, Pires VC, Ribeiro SC, Ferreira SS, Bernardo F, Evtyugin D, Coimbra MA, Silva CCG. Exopolysaccharide (EPS)-producing *Streptococcus thermophilus*: functional and probiotic potential. *Foods*. 2025;14(17):3013. doi:10.3390/foods14173013.
48. Pimenta RS, et al. Microbial community profiling of Brazilian artisanal cheeses reveals regional diversity and high prevalence of lactic acid bacteria. *Int Dairy J*. 2021;113:104910.
49. Grizon A, Theil S, Callon C, Gerber P, Helinck S, Dugat-Bony E, Bonnarme P, Chassard C. Genetic and technological diversity of *Streptococcus thermophilus* isolated from the Saint-Nectaire PDO cheese-producing area. *Front Microbiol*. 2023;14:1245510. doi:10.3389/fmicb.2023.1245510.
50. Margalho LP, Feliciano MD, Silva CE, Abreu JS, Piran MVF, Sant’Ana AS. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties: insights through

multivariate analysis. *J Dairy Sci.* 2020 Sep;103(9):7908–26. doi:
10.3168/jds.2020-18194.

51. Rocha R, Vaz Velho M, Santos J, Fernandes P. Serra da Estrela PDO cheese
microbiome as revealed by next generation sequencing. *Microorganisms.*
2021;9(10):2007. doi:10.3390/microorganisms9102007.

52. Melo JM, Santos AS, Oliveira GR. Artisanal coalho cheese in Seridó Potiguar:
production techniques and economic importance. *Ciência Rural.*
2020;46(12):2120-30.

53. Santos ME, Freitas MR. Public policies and rural development in the semi-arid
region of Rio Grande do Norte: the case of Seridó Oriental. *Revista Territorium.*
2021;5(2):45–59.

54. Marioto LRM, Daniel GC, Gonzaga N, Mareze J, Tamanini R, Beloti V.
Deteriorating potential of mesophilic, psychrotrophic, thermotolerant and
sporulated microbiota in raw milk. *Braz Anim Sci.* 2020;21:e44034.
doi:10.1590/1809-6891v21e-44034.

55. Xu P, et al. Analysis of the taxonomy and pathogenic factors of *Pectobacterium*
aroidearum L6 using whole-genome sequencing and comparative genomics.
Front Microbiol. 2021;12. doi:10.3389/fmicb.2021.679102.

56. Van Gijsegem F, Van Der Wolf JM, Toth IK, editors. Plant diseases caused by
Dickeya and *Pectobacterium* species. Cham: Springer International Publishing;
2021.

57. Oniciuc EAA, Walsh CJ, Coughlan LM, Awad A, Simon CA, Ruiz L, Crispie F, Cotter
PD, Alvarez-Ordóñez A. Dairy products and dairy-processing environments as a
reservoir of antibiotic resistance and quorum-quenching determinants as

revealed through functional metagenomics. *mSystems*. 2020;5(1):e00723-19.
doi:10.1128/mSystems.00723-19.

58. Delannoy S, Tran ML, Fach P. Insights into the assessment of highly pathogenic
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and raw milk cheeses by high
throughput real-time PCR. *Int J Food Microbiol*. 2022;366:109564. doi:
10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109564.

59. Oliveira JMC, et al. Influence of autochthonous lactic acid bacteria cultures on
the microbiota and biogenic amine production in medium-ripened artisan goat
cheese. *Foods*. 2025;14(9):1561. doi:10.3390/foods14091561.

APÊNDICE A. REGISTRO FOTOGRÁFICO DA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS
DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL.

