

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE MINAS
GERAIS – *CAMPUS* BAMBUÍ
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Anderson Figueiredo de Carvalho

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS A PARTIR DO
QUEIJO ARTESANAL DO SUDOESTE DO PARANÁ**

BambuÍ
2026

Anderson Figueiredo de Carvalho

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS A PARTIR DO
QUEIJO ARTESANAL DO SUDOESTE DO PARANÁ**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do
Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus* Bambuí
como pré-requisito para obtenção do grau de Licenciado
em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Gustavo Augusto Lacorte

Coorientador: Dr. Raphael Steinberg da Silva

Bambuí

2026

Catlogação na Fonte Biblioteca IFMG - *Campus Bambuí*

C331d Carvalho, Anderson Figueiredo de.

Diversidade de bactérias lácticas isoladas a partir do queijo artesanal do Sudoeste do Paraná [manuscrito] / Anderson Figueiredo de Carvalho – 2026.

29 f. : il. ; color.

Orientador: Gustavo Augusto Lacorte. Coorientador: Raphael Steinberg da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto Federal de Minas Gerais. *Campus Bambuí*.

1. Bactérias do ácido láctico (BAL). 2. Queijo colonial do Paraná. 3. Diversidade microbiológica. 4. Caracterização molecular. I. Lacorte, Gustavo Augusto. II. Silva, Raphael Steinberg da. III. Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus Bambuí*. IV. Título.

CDD 637.3

Catlogação: João Batista Rodrigues - CRB-6/2022

Anderson Figueiredo de Carvalho

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS A PARTIR DO
QUEIJO ARTESANAL DO SUDOESTE DO PARANÁ**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do
Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus* Bambuí
como pré-requisito para obtenção do grau de Licenciado
em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ____ / ____ / _____ pela banca examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Augusto Lacorte (Orientador)

Prof. Dr. Raphael Steinberg da Silva (Coorientador)

Lívia Cristina Santos (Membro)

Jonas Guimarães e Silva (Membro)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por me conduzir durante toda minha caminhada acadêmica, me transmitindo a sabedoria necessária para chegar até esse momento tão importante na minha vida.

Por todos da minha família que em algum momento se dispuseram a me ajudar nessa caminhada por mais desafiadora que parecesse, principalmente ao meu pai Emerson que apesar de tudo sempre me incentivou nos estudos. Não posso deixar aqui de mencionar minha família espiritual, a Comunidade Católica Fidelidade da Cruz, por todas orações e incentivos para chegar ao fim dessa jornada.

À Anna Gabriella, minha esposa que esteve comigo, por todo apoio e incentivo durante toda a minha caminhada e de maneira ainda mais exaustiva para a finalização de tudo, meu muito obrigado, amo-te!

Não posso deixar de agradecer aos amigos Carina e Gabriel que o curso me presenteou, sem eles sem dúvida essa jornada teria sido ainda mais árdua, meu muito obrigado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Augusto Lacorte, ao meu coorientador Prof. Dr. Raphael Steinberg da Silva, aos técnicos Ricardo Alexandre e Livia Cristina meu muito obrigado, pela paciência, atenção e disponibilidade em todo esse tempo.

Por fim a todos os professores que durante a minha jornada na instituição foram fundamentais para minha formação acadêmica e profissional.

RESUMO

O grupo das bactérias do ácido láctico (BAL) desempenha um papel fundamental na fermentação e na definição das características sensoriais e de segurança de queijos artesanais. O queijo colonial do Sudoeste do Paraná, elaborado com leite cru, possui grande relevância cultural e econômica, contudo, a carência de padrões de identidade e qualidade torna essencial o conhecimento de sua microbiota nativa. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar molecularmente as BAL presentes em amostras de queijo colonial do Paraná, obtidos a partir de uma parceria com a UTFPR – *Campus* Francisco Beltrão. Foram analisados 89 isolados iniciais, submetidos a testes fenotípicos de catalase e coloração de Gram, seguidos pelas técnicas moleculares de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)_s e PCR-ARDRA para identificação. Após a triagem fenotípica, 58 isolados catalase-negativos e Gram-positivos prosseguiram para a caracterização molecular. Foram identificados 36 perfis genéticos distintos por rep-PCR, e a análise por PCR-ARDRA permitiu a identificação de espécies do gênero *Lactobacillus*, com predominância dos grupos: *L. plantarum*; *L. paraplantarum*; *L. pentosus*; *L. casei* e *L. paracasei*. Os resultados evidenciam uma rica diversidade microbiana e fornecem subsídios científicos necessários para a regulamentação, controle sanitário e valorização tecnológica do queijo colonial como produto artesanal regional.

Palavras-chave: bactérias do ácido láctico (BAL), queijo colonial do Paraná, diversidade microbiológica, caracterização molecular.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) play a key role in the fermentation and definition of sensory and safety characteristics of artisanal cheeses. Colonial cheese from southwest Paraná, produced with raw milk, has great cultural and economic relevance; however, the lack of identity and quality standards makes the knowledge of its native microbiota essential. The objective of this study was to isolate and molecularly identify LAB present in samples of colonial cheese from Paraná. Eighty-nine initial isolates were analyzed and subjected to phenotypic catalase and Gram staining tests, followed by molecular techniques of rep-PCR (GTG)₅ fingerprinting and PCR-ARDRA for identification. After phenotypic screening, 58 catalase-negative and Gram-positive isolates proceeded to molecular characterization. Thirty-six distinct genetic profiles were identified by rep-PCR, and PCR-ARDRA analysis allowed the identification of species of the *Lactobacillus* genus, with a predominance of the *L. plantarum* / *L. paraplantarum* / *L. pentosus* and *L. casei* / *L. paracasei* groups. The results highlight the rich microbial diversity of colonial cheese and provide the scientific data necessary for its regulation, sanitary control, and technological valorization as a regional artisanal product.

Keywords: lactic acid bacteria (LAB); colonial cheese from Paraná; microbial diversity; molecular characterization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1 Queijo	11
2.2 Queijo Colonial do Paraná	12
2.3 Bactérias do Ácido Lático.....	12
2.3.1. Relação de BAL e produção e maturação de queijos artesanais.....	13
2.3.2. Isolamento e identificação molecular de BAL	14
3. METODOLOGIA	15
3.1 Obtenção dos isolados presuntivos de BAL do queijo colonial.....	15
3.2 Expansão e confirmação das características fenotípicas de isolados presuntivos de BAL	15
3.2.1 Reativação e estria de esgotamento.....	15
3.2.2 Teste de Catalase	16
3.2.3 Coloração de Gram	16
3.3 Extração de DNA bacteriano dos isolados presuntivos de BAL	17
3.4 <i>DNA Fingerprinting</i> rep-PCR (GTG) ₅	18
3.5 PCR-ARDRA.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1 Confirmação das características fenotípicas de isolados presuntivos de BAL	21
4.2 <i>DNA Fingerprinting</i> REP-PCR (GTG) ₅	22
4.3 Identificação molecular dos isolados	23
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

O grupo de bactérias do ácido láctico (BAL) é bem heterogêneo, isso se dá por estas bactérias ocorrerem em uma vasta diversidade de gêneros, com origens evolutivas distintas, já que evolutivamente compõe um grupo monofilético (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; PAIXÃO, 2016;). É comum encontrar BAL em leites e derivados, plantas, grãos e no Trato Gastrointestinal (TGI) de vertebrados, pois estes microrganismos são preponderantes na microbiota de alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas (LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2000; CARVALHO, 2007).

O queijo é um alimento obtido a partir da fermentação do leite, ou seja, por meio da ação do metabolismo bacteriano, o leite passa por um processo de coagulação e se torna um produto de consumo. Comumente nesse processo pode ocorrer o acréscimo de culturas iniciadoras, culturas adjuntas, dentre outros tipos, como também de mediadores desse processo. Por fim, podem ter características bem distintas, gerando produtos de diferentes tamanhos, formas e sabores (PARENTE *et al.*, 2017).

No Brasil, existem uma grande diversidade de queijos produzidos artesanalmente. O queijo colonial do Sudoeste do Paraná é um exemplo, pois apresenta não somente um aspecto cultural, como também está interligado com as tradições históricas locais. Este derivado do leite é caracterizado por ser um queijo produzido a partir do leite cru e possuir poucos dias de maturação, além de ser um produto produzido com base em técnicas manuais e, por isso pode ser considerado um produto artesanal (CISLAGHI; BADARÓ, 2021).

De maneira geral as BAL vão atuar consumindo os carboidratos presentes no leite e liberando ácido láctico, como produto final de sua fermentação (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001; AOUDIA *et al.*, 2016). Contudo, a sua diversidade metabólica pode gerar alterações em outros aspectos, de acordo com a atuação de cada BAL presente, isso não apenas pelas suas singularidades, como também pelas relações que as mesmas vão estabelecer nesse ambiente. Por exemplo algumas BAL's são capazes de fermentar ácido cítrico em diacetil, que por sua vez apresenta importante papel na produção de um paladar complexo em produtos lácteos (HUTKINS, 2006).

Dado isso, as bactérias são essenciais na fabricação de queijo e a sua diversidade auxilia nas características marcantes do produto. Auxílio esse que em sua maioria tem caráter positivo para o produto, contudo também podem atuar de modo negativo alterando características que em alguns casos inviabilizam o produto.

Diante do exposto, é de grande importância para a região do Sudoeste do Paraná conhecer melhor a microbiota do queijo colonial e assim conseguir estabelecer os parâmetros de controle de qualidade da produção do queijo colonial, a fim de obter a regulamentação desse produto e evitar danos à saúde de seus consumidores.

Sendo assim o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar por meios moleculares os isolados de BAL obtidos através de amostras de queijo colonial do Paraná, adquirindo informações sobre a diversidade presente nesse queijo.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Queijo

O queijo é um produto que dentre os derivados do leite, possui registro há mais tempo na história, o que lhe confere destaque, além de ser um produto de alta demanda. Considerada por muitos como uma arte, a produção de queijo foi refinada com o passar do tempo, principalmente em relação aos aspectos de apresentação do produto, sabor e aroma (STEINBACH, 2017; SILVA, 2005; VALSECHI, 2001).

O queijo apresenta toda essa variedade devido à influência exercida pela matéria prima, manejo e técnicas empregadas na fabricação (ATTORNI *et al.*, 2014). A partir disso, no Brasil passou-se a ter diversos tipos de queijos, isso pode ser facilmente explicado quando se analisa a dimensão territorial do país, além é claro da influência cultural de cada povo que colonizou o país; proporcionando assim queijos específicos para cada região produtora.

No Brasil, o queijo foi regulamentado pela portaria 146 de 1996 que diz:

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Entende-se por queijo fresco o que está pronto para o consumo logo após sua fabricação.

Entende-se por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo.

A denominação QUEIJO está reservada aos produtos em que a base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não láctea (Portaria MAPA - 146, de 07/03/1996).

Pesquisas revelam que o Brasil se encontra dentre os 5 maiores produtores de queijo no mundo, isso porque o mesmo é um produto que aumenta o valor agregado à sua matéria prima ocasionando assim um aumento na renda das regiões produtoras, certamente influenciando no desenvolvimento local e conseqüentemente na criação/caracterização de uma identidade cultural local bastante consistente (EMBRAPA, 2019).

O crescimento do queijo no país pode ser exemplificado por meio do aumento da participação em vendas saindo de 12,8% em 2005 para cerca de 23,7% no ano de 2016, e é visto a cada dia como um alimento nutritivo e fácil consumo (EMBRAPA, 2019).

2.2 Queijo Colonial do Paraná

Um queijo de destaque na região Sul do Brasil é o queijo colonial do Paraná, que recebe esse nome por ser um produto que descende da forma do saber-fazer dos povos que imigraram para a região e assim ficaram conhecidos como os ‘colonos’, carregando consigo as referências do modo de vida, suas formas de fazer agronegócio e de ocupar o território. (CISLAGHI *et al.*, 2021).

Além da grande cultura carregada por esse queijo, o mesmo veio como modo de agregar valor à produção de leite bastante praticada na região o que proporciona uma elevação significativa na renda dos produtores, de modo mais enfático nos pequenos. Todavia essa prática acarretou um produto primordialmente artesanal e familiar o que acabou transformando-o em um produto sem padrões, inviabilizando assim um controle de qualidade e até de identidade. (CISLAGHI *et al.*, 2021; TESSER, 2014; FARIÑA *et al.*, 2012; REZENDE *et al.*, 2010; SEBRAE, 2008).

O queijo colonial do Paraná é tipicamente produzido com o leite cru, caracterizado por ter uma casca fina, lisa e de cor amarelo-palha, em seu interior apresenta cor esbranquiçada e é possível encontrar furos dispersos; de sabor tipicamente picante, comumente maturado por 10 a 20 dias (STEINBACH, 2017; TESSER, 2014).

O fato de se tratar de um produto artesanal e carregar consigo uma singularidade em cada queijo, justamente por ocorrer essa preservação do saber-fazer e a manutenção das técnicas manuais causa grande preocupação com a qualidade do produto, uma vez que para chegar em um produto final e de qualidade são necessárias condições árduas higiênico-sanitárias e, nos moldes atuais essas condições nem sempre são alcançadas. Contudo, a proibição do produto não é algo viável para a economia local, o que torna ainda mais urgente o estabelecimento de legislações específicas que caracterizem o queijo, para assim viabilizar a avaliação, o controle e a fiscalização de modo que não o descaracterize, mas possa garantir ao seu consumidor um produto de qualidade (CISLAGHI *et al.*, 2021; STEINBACH, 2017; TESSER, 2014; FARIÑA *et al.*, 2012).

2.3 Bactérias do Ácido Lático

As BAL's são conhecidas por sua atuação em consumir lactose para produzir ácido láctico. Esse consumo pode ocorrer por duas vias, homofermentativas ou heterofermentativas, a depender logicamente dos produtos que foram gerados. As homofermentativas usam a glucose

para gerar ácido láctico como produto final, já as heterofermentativas além de ácido láctico produzem também etanol e ácido acético (PAIXÃO, 2016; BRUNO, 2011; CARR *et al.*, 2002;).

Ademais formam um grupo não-monofilético de bactérias com células procarióticas, gram-positivas, com morfologias de cocos, diplococos, cocobacilar e bastonetes, catalase negativa e não esporuladas. Com isso os principais gêneros desse grupo são: *Lactobacillus*; *Leuconostoc*; *Pediococcus*; *Lactococcus*; *Streptococcus*; *Carnobacterium*; *Enterococcus*; *Oenococcus*; *Tetragenococcus*; *Vagococcus* e *Weissella* (STEINBERG, 2016; BRUNO, 2011;).

Por possuírem um grupo de microrganismos tão diversos as bactérias do ácido láctico se associam as carnes, plantas e laticínios estabelecendo as mais diversas relações (BRUNO, 2011). Além disso, tais bactérias ganharam tamanha notoriedade por apresentarem elevado potencial tecnológico nos alimentos, contudo também são causa de preocupação devido a sua atuação como agente etiológico de algumas doenças (BRUNO, 2011; MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003).

2.3.1. Relação de BAL e produção e maturação de queijos artesanais

São utilizadas em larga escala na produção de iogurtes, leites fermentados e queijos, as BAL atuam de maneira assídua na preservação dos alimentos (PAIXÃO, 2016). Especificamente no queijo por meio do processo de fermentação, atuam acidificando o leite e acelerando sua coagulação; atuam também na liberação do soro e ao fim do processo em seu sabor, corpo e textura (SILVA, 2011; AWAD *et al.*, 2007).

O queijo como um produto derivado do leite, carrega consigo as características do produto que lhe deu origem, portanto é de extrema importância que se tenha um leite de boa qualidade microbiológica, que tenha sido manuseado mantendo as práticas adequadas higiênico-sanitárias. Contudo, esse cuidado deve ser mantido em todo o processo de produção, uma vez que a contaminação está possível em toda a cadeia produtiva, e o consumidor anseia por receber um produto de qualidade. (STEINBACH, 2017)

Estudos apontaram que além de atuarem na preservação dos alimentos, as BAL's possuem uma ação probiótica, ou seja, atuam de maneira a inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas e isso ocorre através de substâncias produzidas como alguns ácidos orgânicos, bacteriocinas e fatores antimicrobianos, o que já ajuda no controle significativo da microbiota benéfica do alimento (DHEWA, 2012; MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003).

2.3.2. Isolamento e identificação molecular de BAL

Da grande diversidade de gêneros pertencentes ao grupo das BAL's, os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*; são os mais comuns de serem encontrados em queijos (BERESFORD *et al.*, 2001; FOX *et al.*, 2000). A partir dessa enorme variabilidade se abre um leque de possíveis meios de cultura para o isolamento das mesmas, contudo segundo Carvalho (2007) a utilização de meios seletivos como ágar M17, ágar Rogosa acidificado ou o ágar De Man Rogosa e Sharpe (MRS) são os mais adequados para o isolamento dos microrganismos em questão.

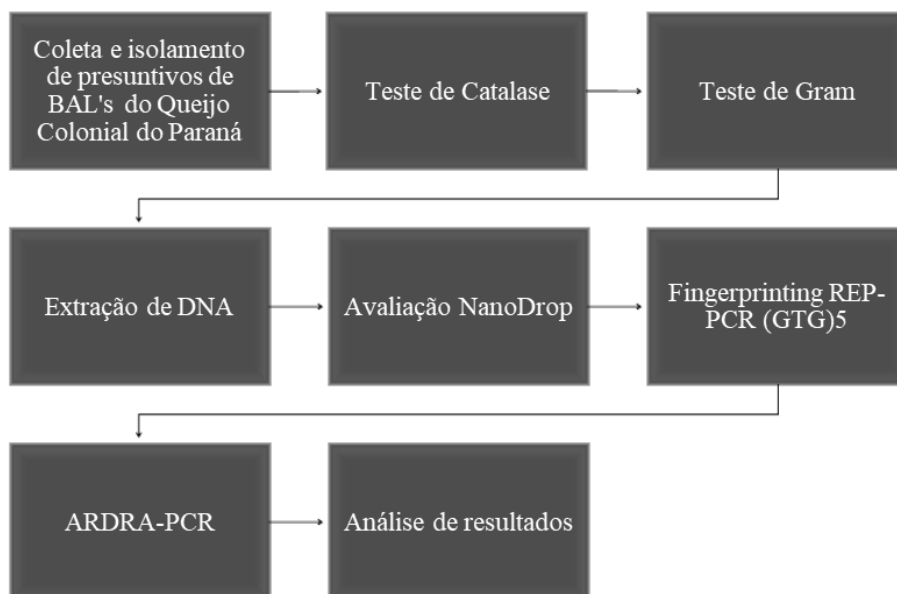
A incubação ocorre em uma temperatura de 37°C, por 48 horas (FREIRE, 2021; EMBRAPA, 2009; RESENDE, 2011). Em seguida, as colônias já isoladas são submetidas a teste fenotípicos para comprovação se os isolados realmente fazem parte do grupo das BAL, não obstante não se identificam o gênero ou espécie, para isso é necessário o uso de técnicas complementares (FREIRE, 2021).

Umas das vias de identificação é por meio da biologia molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), na qual se amplifica a região intergênica 16S-23S, devido a variabilidade que essa região apresenta entre as espécies, seguido de posterior restrição de endonucleases específicas permitindo assim seu uso para identificação desses isolados. (FREIRE, 2021; MOREIRA *et al.*, 2005).

3. METODOLOGIA

No intuito de melhor compreender o caminho percorrido neste trabalho, a figura 01 apresenta a ordem dos processos que foram realizados para se chegar aos resultados obtidos.

Figura 1. Fluxograma de trabalho



Fonte: Autor, 2025.

3.1 Obtenção dos isolados presuntivos de BAL do queijo colonial

Os isolados presuntivos de Bactérias do Ácido Lático foram obtidos por meio de uma parceria entre o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – *Campus* Bambuí (IFMG – *Campus* Bambuí) e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Francisco Beltrão (UTFPR – *Campus* Francisco Beltrão). Os isolados foram enviados em microtubos de 1,5mL de cultura bacteriana acrescida de 20% de glicerol refrigeradas.

3.2 Expansão e confirmação das características fenotípicas de isolados presuntivos de BAL

3.2.1 Reativação e estria de esgotamento

Inicialmente os isolados recebidos foram reativados em duplicatas nos tubos de polipropileno de 15 mL, a reativação ocorreu inoculando 50 µL do congelado em glicerol em

5 mL de caldo MRS, em seguida os tubos foram incubados em estufa bacteriológica (SSB – MYLABOR EQUIPAMENTOS) a 37°C em aerobiose por cerca de 18 a 24 horas.

Posteriormente foi realizado a confirmação da pureza de cada isolado, por meio de uma estria de esgotamento em placas contendo meio ágar MRS incubadas em estufa, nas condições descritas anteriormente. A partir da estria de esgotamento e a confirmação da pureza dos isolados, foi realizada a coleta de colônias bacterianas isoladas para realização de testes fenotípicos de confirmação BAL presuntivas.

3.2.2 Teste de Catalase

O primeiro teste fenotípico que os isolados crescidos em placa foram submetidos foi o de catalase. Este teste consiste em saber, através da inserção da colônia de bactéria em peróxido de hidrogênio, se o isolado possui a enzima peroxidase, responsável pela quebra do peróxido de hidrogênio em gás oxigênio (O₂) e água (H₂O). Neste teste, um resultado positivo é caracterizado pela presença de bolhas, o que indica a presença da enzima que realiza, portanto, a quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Por outro lado, caso não ocorra a liberação de O₂, tem-se um resultado negativo para presença da enzima, o resultado é expresso de maneira quase que imediata a homogeneização da colônia com o peróxido, o que se torna de interesse desse estudo os isolados que apresentarem resultado negativo neste teste.

3.2.3 Coloração de Gram

Antecede o teste de coloração de Gram a preparação da lâmina, esse processo consiste em fixar o material biológico em uma lâmina de vidro, para isso primeiramente realiza-se um esfregaço de uma colônia bacteriana em solução salina 0,85%, em seguida é necessário realizar a fixação do material, que se resume a secagem do esfregaço. A coloração de Gram consiste na aplicação de cristal violeta por 60 segundos, seguida da lavagem da lâmina com água destilada, depois é aplicado lugol por 60 segundos, realizando uma nova lavagem após essa preparação com água destilada, seguida da aplicação de solução descolorante por 15 segundos, seguida de lavagem com água destilada, por fim foi aplicada solução de safranina por 60 segundos com finalização com uma última lavagem com água destilada.

Após secagem, as preparações foram observadas em microscópio ótico (Equinox 600 Séries – LEIPZIG) em objetiva de 100x juntamente com o auxílio do óleo de imersão. Esse teste difere as bactérias em dois grandes grupos o das Gram-positivo, na qual são bactérias que

retém o cristal violeta por causa da espessa camada de peptidoglicano resultando em uma coloração de cor roxa, e o das Gram-negativas se caracterizam por uma camada mais fina de peptidoglicano e por isso não retém o cristal violeta, apresentando assim coloração rosa devido à contra coloração com safranina que se fixa no final do processo. Desse modo, após a coloração, foram utilizados os isolados permaneceram os isolados classificados como Gram-positivos, os quais podem apresentar formas de cocos isolados, cocos em cadeias, cocobacilos e bastonetes.

3.3 Extração de DNA bacteriano dos isolados presuntivos de BAL

A partir dos isolados catalase negativos e Gram positivos crescidos em caldo MRS por 18h à 37° C, foi realizada a extração do material genético (DNA). O caldo crescido foi centrifugado (UNIVERSAL 320R - HETTICH) a 3.000 RPM por 15 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado, restando o pellet, que foi lavado com 5 mL de água MilliQ autoclavada. Em seguida foi centrifugado novamente a 3000 RPM por 15 minutos, para novamente descartar o sobrenadante e assim ressuspender o pellet em 1 mL de solução de Cloreto de lítio (LiCl) 5M autoclavado (DINÂMICA). Em seguida, a amostra é homogeneizada em vórtex até a homogeneização, posteriormente transferida para um eppendorff de 2 mL e incubada no Shaker (SL-222 - SOLAB) sob 230 RPM, a temperatura ambiente, durante 60 minutos.

Após esse período de incubação, a amostra foi centrifugada (SL-703 - SOLAB) a 14.000 RPM por 10 minutos, seguido do descarte do sobrenadante, e foi acrescentado 1 mL da solução de Tris (ÊXODO CIENTÍFICA) - EDTA (NEON) (TE) contendo Lisozima (LUDWIG) sobre o pellet, o qual foi incubado novamente no Shaker (SL-222 - SOLAB) sob 230 RPM, a 37°C, durante 60 minutos.

Ao término dessa segunda incubação, as amostras são centrifugadas novamente a 14.000 RPM por 10 minutos, descartado o sobrenadante do eppendorff o pellet foi ressuspensionado com 500 µL de TE pH 8.0 e homogeneizado em vórtex, seguido do acréscimo de 100 µL de SDS 10%, com posterior agitação por inversão, e acrescido 600 µL de solução fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v), seguido de vórtex.

Em seguida a amostra foi centrifugada mais uma vez a 14.000 RPM por 10 minutos. Imediatamente retirou-se a fase superior (transparente) que foi formada para um novo eppendorff, seguido do acréscimo de 600 µL da solução fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v), homogeneizado em vórtex, centrifugados mais uma vez a 14000 RPM por 10

minutos. Consecutivamente retira-se a fase superior para um novo eppendorff, seguido do acréscimo de 700 µL de clorofórmio P.A. gelado, vortexado, centrifugado novamente a 14000 RPM por 10 minutos, transferindo a fase superior para um novo eppendorff. Por fim foi acrescentado sobre o volume de fase aquosa recuperados 2 volumes de isopropanol gelado, deixando os tubos no freezer à -20° C *overnight*.

Após este período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 14000 RPM, a 4°C, por 15 minutos, retira-se o sobrenadante e em seguida lava-se o pellet com 500 µL etanol 70% gelado, essa lavagem foi realizada duas vezes, seguida da etapa de secagem do pellet em estufa a 65° C com posterior ressuspensão do pellet em 50 µL de TE.

A amostra de DNA genômica obtida da extração foi submetida a quantificação e análise de qualidade por meio do aparelho NanoDrop One© (Microvolume UV-Vis Spectrophotometer – THERMO SCIENTIFIC), que exibiu valores de sua concentração em ng/uL, além das relações 260/280, que se refere a contaminação da amostra com proteínas, e 260/230, contaminação por solventes orgânicos, pois é ideal encontrar valões entre 1,8 – 2,0 para ambos os parâmetros.

3.4 DNA Fingerprinting rep-PCR (GTG)₅

A técnica de *fingerprinting* rep-PCR (GTG) 5 permite a replicação de regiões diversas do material genético, proporcionando assim regiões de amplicons distintos para amostras de cepas diferentes e resultado parecido para amostras geneticamente iguais.

Isso foi comprovado com os trabalhos desenvolvidos por D. Gevers *et al* em 2001 e posteriormente confirmado em 2008 por K. Van Hoorde *et al*. a técnica de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)₅ é de grande eficácia para a filtragem de cepas com genética semelhantes, por isso foi aplicada nesse estudo com o intuito de reduzirmos as cepas geneticamente iguais para a próxima etapa.

A reação utilizada continha 25 uL é composta por 2uL do iniciador GTG₅: 5' GTG GTG GTG GTG 3' na concentração de 10pmol/uL, 2uL do mix de desoxirribonucleotídeo trifosfato que estava na concentração de 10 pmol/uL – 10nM, 2,5uL de tampão de reação 10X, 2uL de cloreto de magnésio (MgCl₂ - 5nM), 0,4uL de Taq Pol (Cellco Biotech) a 5u/uL, 2,0 uL de DNA bacteriano (70ng/uL) e 12,1uL de água ultra pura.

O programa de amplificação usado foi: 94°C por 7 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 40°C por 1 minuto, 65°C por 8 minutos e 65°C por 16 minutos; usando o termociclador (T100 – BIORAD).

Posto isso, para constatar os resultados o produto de PCR foi revelado por eletroforese em gel de agarose 1,4%, a 135 volt's por 150 minutos e usando TAE como tampão de corrida, seguido de coloração com brometo de etídeo e visualizado no transiluminador (EC 020 - NOVA) em exposição a luz ultravioleta (UV). Consequentemente isolados que apresentaram o mesmo padrão de *fingerprinting* foram considerados idênticos geneticamente o que levou a permanência de apenas 1 isolado por perfil distinto encontrado no experimento.

3.5 PCR-ARDRA

Com o intuito de identificar o gênero e espécie dos isolados tidos como presuntivos de BAL's realizou-se segundo o que já havia sido proposto em 2005 por Morreira *et al* e reforçado em 2014 por Sandes *et al*, uma Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (PCR-ARDRA). Nesse ensaio foi realizada, uma amplificação da região espaçadora intergênica 16S-23S dos isolados, usando assim os iniciadores que se anelam às regiões conservadas do gene codificador do rRNA 16S e rRNA 23S. Portanto a reação continha 15uL, foi composta por 1,5uL do iniciador 16-1A, 5' – GAATCGCTAGTAATCG – 3' (), 1,5uL do iniciador 23-1B, 5'-GGGTTCCCCCATTCGGA-3(), 7,5uL de Master Mix (Promega Madison, WI USA) (2X), 2,5uL de água ultrapura e 2uL do DNA bacteriano (70ng/uL).

O programa utilizado foi de: 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72° por 5 minutos; no termociclador (T100 - BIORAD). Os produtos de pcr em questão foram revelados por eletroforese em gel de agarose a 2%, a 135 volt's por 100 minutos e usando TAE como tampão de corrida, seguido de coloração com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador (EC 020 - NOVA) em exposição a luz ultravioleta (UV).

Neste ensaio o resultado esperado são *amplicons* de tamanho entre 500 a 600 bp, nos quais são esperados 3 perfis possíveis, de modo que: o perfil com apenas um *amplicon* indica bactérias pertencentes aos gêneros: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, e *Streptococcus* as com dois *amplicons* ao gênero: *Enterococcus*; e com três *amplicons* aos gêneros: *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Weissella* e *Lactobacillus*. Para os isolados que apresentaram perfil com 3 *amplicons*, foi realizada digestão dos produtos de PCR com: doze enzimas (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *AsuII*, *EcoRV*, *DraI*, *AseI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*), usando o tampão fornecido pelo fabricante para cada uma e as incubando a uma temperatura de 37°C *overnight*.

O resultado desta restrição também foi resolvido por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,4%, a 70 volt's por 180 minutos e usando TAE como tampão de corrida, seguido de coloração com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador (EC020 - NOVA) em exposição a luz ultravioleta (UV).

Desse modo comparou-se o resultado com os padrões de restrição identificados por Sandes *et al*, 2014, e por Steinberg *et al*, 2016, além de todos os isolados agora comporem a coleção taxonômica de microrganismo do IFMG – *Campus* Bambuí.

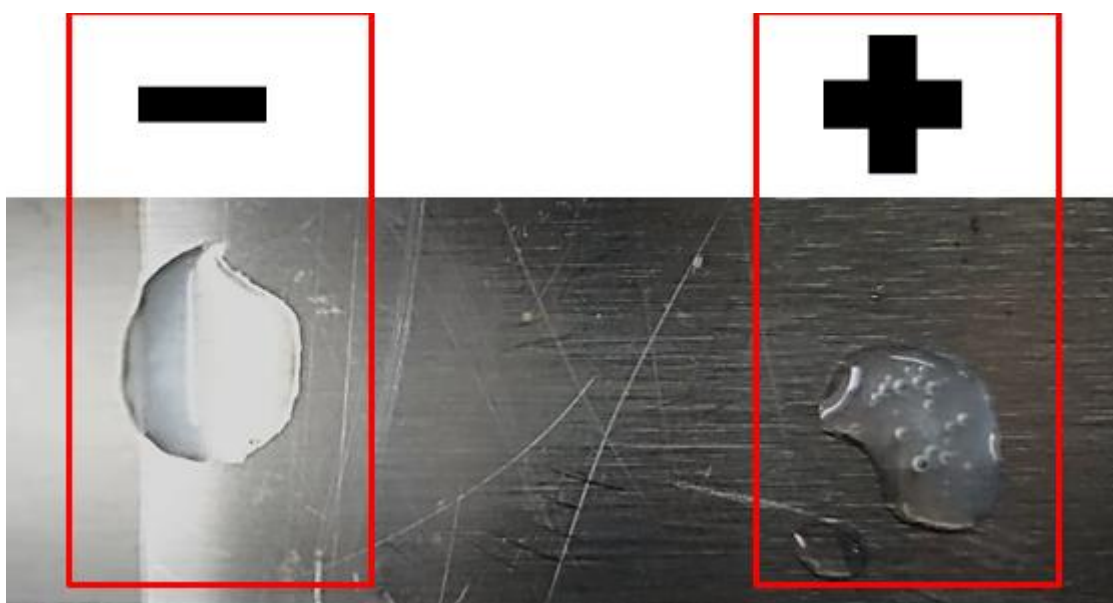
4. RESULTADOS

4.1 Confirmação das características fenotípicas de isolados presuntivos de BAL

Foram enviadas um total de 89 amostras de isolados bacterianos, contudo, no processo de reativação 8 isolados não cresceram e assim foram descartados. Após o crescimento dos 81 isolados, 1 isolado revelou na placa ser pertencente ao gênero *Bacillus* e como não era do interesse do estudo, foi descartado.

Dos 80 isolados restantes aplicou-se o teste de catalase, como pode ser visualizado na Figura 2, nesse teste 7 apresentaram resultado positivo para a enzima e, por isso foram descartados, decorrendo, portanto, 73 isolados de resultado negativo para catalase, passando assim para a coloração de gram.

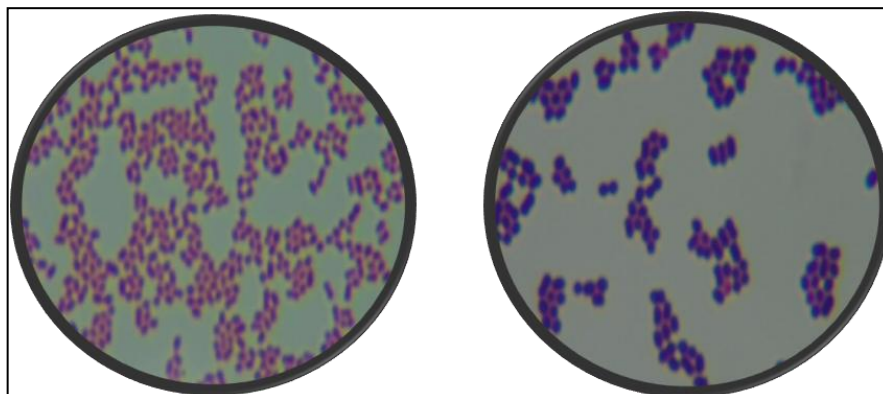
Figura 2. Resultados esperados para o Teste de Catalase: resultado negativo apresentado à esquerda e o resultado positivo apresentado à direita da imagem.



Fonte: Autor, 2025.

Na avaliação da coloração de Gram 15 isolados apresentaram coloração de aspecto Gram-negativo, conforme pode ser visualizado na figura 3, foram assim descartados. Desse modo os 58 isolados que apresentaram coloração Gram-positiva, conforme pode ser visualizado na figura 3, prosseguindo assim com essas amostras para os testes moleculares.

Figura 3. Resultados esperados para o Teste de Gram: perfil esperado para bactérias Gram negativas apresentado à esquerda e à direita o perfil para bactérias Gram positivas.

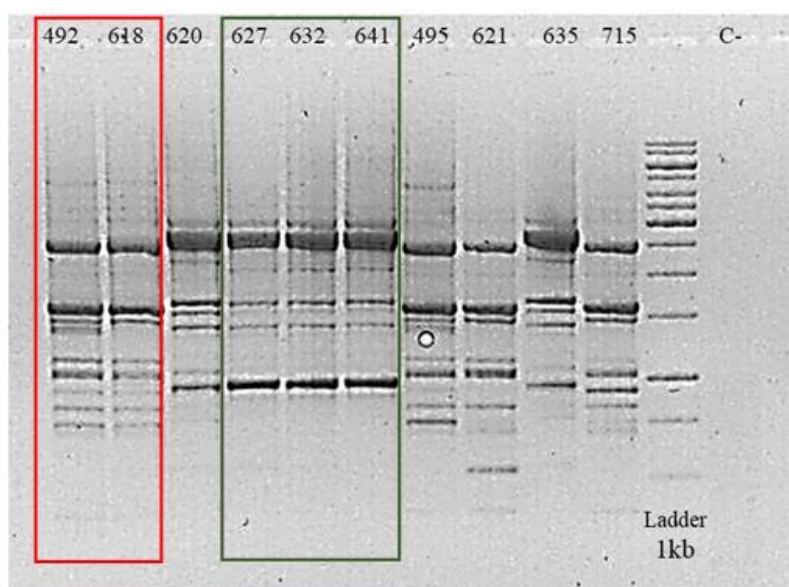


Fonte: Autor, 2025.

4.2 DNA *Fingerprinting* REP-PCR (GTG)5

Para o início dos testes moleculares os isolados passaram pelo protocolo de extração, após os DNAs obtidos foram preparados para a realização de análise de perfil por meio de *fingerprinting* rep-PCR (GTG)5, o que resultou em 36 perfis distintos, ou seja, os 58 isolados ficaram agrupados em 36 perfis, na figura 4 pode ser observado um exemplo na qual existem amostras que foram consideradas geneticamente idênticas e as de perfis distintos.

Figura 4. Eletroforese referente a REP-PCR para um grupo de amostras. As amostras agrupadas nas caixas correspondem à amostras de mesmo perfil genético (*fingerprint*).

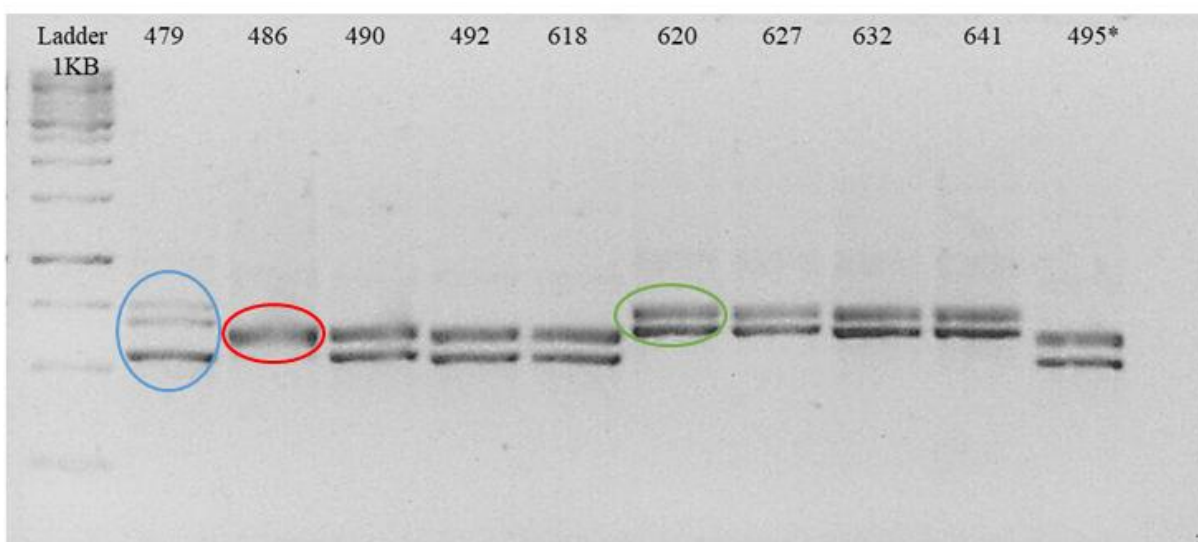


Fonte: Autor, 2025.

4.3 Identificação molecular dos isolados

Posto isso, um isolado de cada um dos 36 perfis foi selecionado para ser realizado o reconhecimento do polimorfismo de tamanho dos espaçadores do transcrito interno I (ITS I), da região dos genes codificadores do rRNA 16S e rRNA 23S. O resultado final obtido nessa etapa foi de 5 perfis com 1 *amplicon*, 24 perfis com 2 *amplicons* e 7 perfis com 3 *amplicons*; é possível na figura 5 visualizar como o resultado fora visto em laboratório.

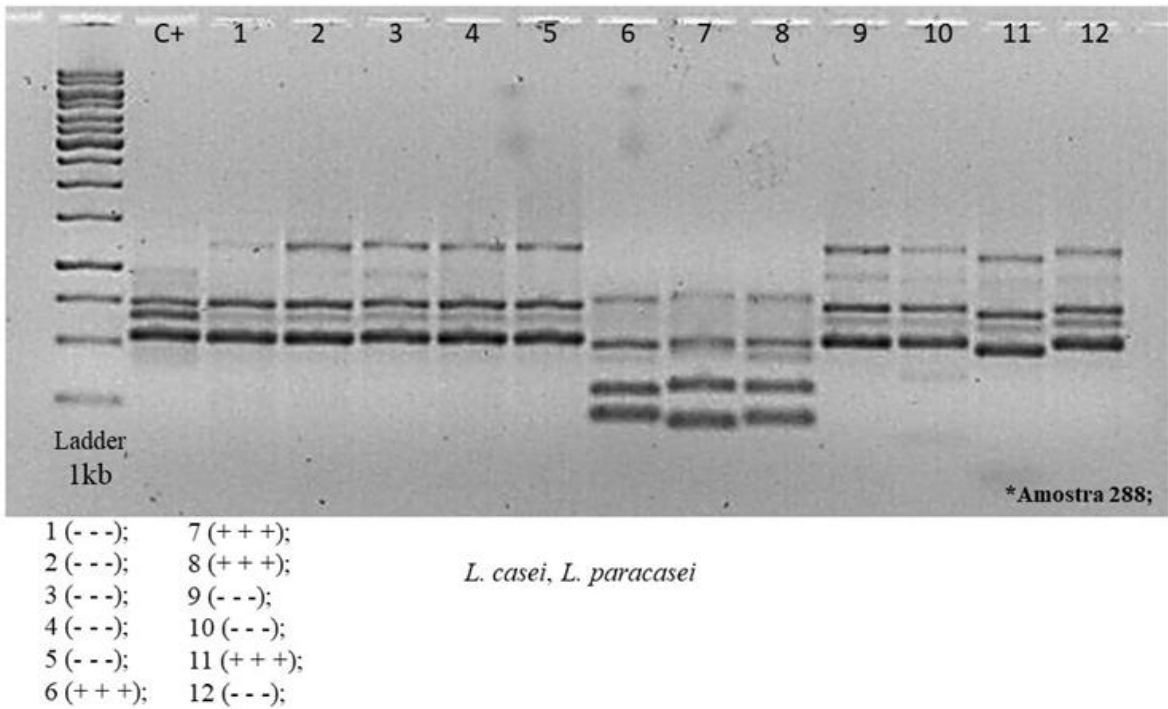
Figura 5. Eletroforese referente à PCR-ARDRA para um grupo de amostras. Padrões diferentes de amplificação foram destacados com cores diferentes na imagem: azul, padrão 3 bandas; vermelho, padrão 1 banda; verde, padrão duas bandas.



Fonte: Autor, 2025.

Os perfis com 3 *amplicons* foram levados para uma análise de restrição por PCR-ARDRA para identificação da espécie, o que resultou na identificação de 3 grupos distintos (Figura 6). Foi possível visualizar o resultado, a divisão foi da seguinte forma: 1 perfil proveniente ao grupo *Lactobacillus plantarum* / *Lactobacillus paraplantarum* / *Lactobacillus pentosus*, 2 perfis ao grupo *Lactobacillus plantarum*, 2 perfis ao grupo *Lactobacillus casei* / *Lactobacillus paracasei* e 2 perfis o padrão de restrição não foi possível realizar uma identificação (Tabela 1)

Figura 6. Eletroforese referente ao perfil de digestão das bandas de PCR-ARDRA para um grupo de amostras.



Fonte: Autor, 2025.

Tabela 1. Resultado da identificação molecular por PCR-ARDRA e análise de restrição (digestão enzimática) dos isolados de bactérias do ácido lático (BAL) provenientes de amostras de queijo colonial do Sudoeste do Paraná.

Perfil Inicial (PCR-ARDRA)	Subgrupo de Identificação	Frequência	Identificação Presuntiva
1 amplicon	-	5 amostras	<i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> e <i>Streptococcus</i>
2 amplicons	-	24 perfis	<i>Enterococcus</i>
3 amplicons	Grupo I	1 perfil	<i>L. plantarum</i> / <i>L. paraplantarum</i> / <i>L. pentosus</i>
	Grupo II	2 perfis	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	Grupo III	2 perfis	<i>Lactobacillus casei</i> / <i>Lactobacillus paracasei</i>
	Não Identificado	2 perfis	Padrão de restrição não identificado

5. DISCUSSÃO

A diversidade de bactérias lácticas (BAL) encontrada no queijo colonial do Sudoeste do Paraná evidencia o potencial biotecnológico deste produto artesanal. A presença de uma microbiota variada é essencial para a bioproteção e conservação do alimento, uma vez que as BAL's atuam na preservação por meio da produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas que inibem o desenvolvimento de patógenos (MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003). Esse grupo de microrganismos é preponderante em alimentos ricos em nutrientes e sua ação metabólica é fundamental para a segurança microbiológica do produto final (PAIXÃO, 2016). Além disso, o consumo de carboidratos e a liberação de ácido lático durante a fermentação são processos centrais para a manutenção da qualidade do derivado lácteo (DHEWA, 2012).

As espécies identificadas, com destaque para os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*, desempenham papéis cruciais na definição das características sensoriais do queijo (AWAD *et al.*, 2007). Durante a produção e maturação, esses microrganismos influenciam diretamente no sabor, corpo e textura do queijo através da acidificação e aceleração da coagulação (SILVA, 2011). A complexidade do paladar é reforçada pela capacidade de certas BAL's de fermentar compostos como o ácido cítrico em diacetil, conferindo nuances aromáticas específicas ao produto (AWAD *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos corroboram estudos que descrevem o queijo colonial como um produto artesanal singular, cuja identidade é moldada pelo saber-fazer tradicional e pela microbiota endógena. A predominância de linhagens específicas reflete as condições de manejo e as técnicas manuais empregadas na região, assemelhando-se ao perfil de outros queijos artesanais brasileiros que dependem da preservação da microbiota nativa para manter sua tipicidade (CISLAGHI *et al.*, 2021; SANDES *et al.*, 2014). Contudo, a variação encontrada reforça que a ausência de padrões de identidade, corroborando com os resultados obtidos no estudo de STEINBERG (2016) quando analisou o perfil de bactérias do ácido lático da região de Minas Gerais, o que enfatiza a necessidade de mais estudos, pois a variação microbiológica ainda é um desafio para o controle de qualidade uniforme (STEINBERG *et al.*, 2016).

A caracterização molecular realizada neste trabalho é um passo fundamental para o melhor conhecimento do componente microbiano do queijo colonial paranaense (CISLAGHI *et al.*, 2021). Tais dados fornecem subsídios científicos essenciais para subsidiar a criação de regulamentações específicas e parâmetros de controle sanitário, visando garantir a segurança alimentar sem descaracterizar o produto artesanal (STEINBACH, 2017).

O estabelecimento dessas legislações é urgente para evitar a clandestinidade e promover a valorização econômica da produção regional. Além disso, a definição clara do que se entende por queijo maturado e suas trocas bioquímicas é necessária para o alinhamento com as normas nacionais vigentes (TESSER, 2014).

Apesar da relevância dos achados, o trabalho aponta para a necessidade de estudos futuros que explorem o potencial tecnológico das cepas isoladas. Perspectivas promissoras incluem a investigação da ação probiótica dessas bactérias, que podem atuar no controle da microbiota intestinal e na inibição de bactérias patogênicas em consumidores (MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003). O uso de técnicas moleculares avançadas, como a PCR, continuará como fator indispensável para o monitoramento e a identificação precisa dessas espécies em novas amostras (FREIRE, 2021; BRUNO, 2011).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo contribuem para o entendimento da diversidade de BAL's presentes no queijo colonial do Sudoeste do Paraná, fornecendo subsídios científicos que podem auxiliar no estabelecimento de parâmetros de qualidade, segurança microbiológica e padronização do produto, sem comprometer suas características artesanais e culturais. Além disso, a identificação dessa microbiota abre possibilidades para estudos futuros voltados à seleção de culturas autóctones com potencial aplicação tecnológica e probiótica.

Por fim, ressalta-se a importância de pesquisas como esta para a valorização dos produtos artesanais regionais, promovendo a integração entre conhecimento científico, segurança alimentar e preservação do saber-fazer tradicional, contribuindo para a regulamentação e fortalecimento da cadeia produtiva do queijo colonial do Paraná.

7. REFERÊNCIAS

- AOUDIA, N. et al. Effectiveness of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* as probiotics in traditional cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8622-8630, 2016.
- AWAD, S. et al. Texture and flavour development in cheese. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1412-1424, 2007.
- BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 07 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília, DF: MAPA, 1996.
- BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. **Microbiota láctica de queijos artesanais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 30 p. (Série Documentos, 124).
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.
- CISLAGHI, F. P. C.; BADARÓ, A. C. Dilemas da produção de queijo colonial artesanal do Sudoeste do Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 15, n. 1, p. 3314-3331, abr. 2021.
- DHEWA, T. et al. Probiotics: preventive and clinical applications. **Biotechnology Research Bulletin**, v. 1, p. 15-20, nov. 2012.
- EMBRAPA. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.
- EMBRAPA. **Anuário do Leite 2019**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2019.
- FARIÑA, L. O. et al. Caracterização do queijo colonial produzido no Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 386, p. 25-31, set./out. 2012.
- FOX, P. F. et al. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 592 p.
- GEVERS, D. et al. Applicability of rep-PCR fingerprinting with the (GTG)₅ primer for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 1, p. 31-36, nov. 2001.

- HUTKINS, R. W. **Microbiology and Technology of Fermented Foods**. 1. ed. Ames: IFT Press/Blackwell Publishing, 2006. 473 p.
- LÓPEZ-DÍAZ, T. M. et al. Microbial flora of Cow's milk cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 511-519, 2000.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001.
- MARTINIS, E. C. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 32-37, jan./mar. 2001.
- MOREIRA, J. L. et al. PCR-ARDRA for identification of lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 2, p. 110-121, nov. 2005.
- PAIXÃO, M. G. **Microbiologia de Alimentos**. Paranavaí: IFPR, 2016. (Manual Técnico).
- RESENDE, M. F. **Técnicas de Isolamento Bacteriológico**. Belo Horizonte: UFMG, 2011.
- REZENDE, P. H. L. *et al.* Aspectos sanitários do queijo Minas artesanal comercializado em feiras livres. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 65, n. 377, p. 36-42, nov./dez. 2010.
- SANDES, S. H. C. et al. Selection of lactic acid bacteria with probiotic potential from colonial cheeses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, n. 5, p. 1571-1579, out. 2014.
- SEBRAE. **O queijo artesanal no Brasil**. Brasília, DF: SEBRAE, 2008. (Série Estudos Setoriais).
- SILVA, N. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2005.
- SILVA, R. A. **Tecnologia de Produtos Lácteos**. São Paulo: Varela, 2011.
- STEINBACH, J. **Caracterização do queijo colonial da microrregião de Francisco Beltrão - PR e estudo com consumidores**. 2017. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2017.

STEINBERG, R. S. **Diversidade de bactérias lácticas em queijos artesanais**. 2016. 120 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

TESSER, M. **Caracterização do queijo colonial artesanal**. 2014. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2014.

VALSECHI, O. A. **Tecnologia de Queijos**. Araras: UFSCar, 2001. 50 p.

VAN HOORDE, K. et al. Validation of (GTG)₅-rep-PCR for fingerprinting of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 105-111, maio 2008.