



THALISSA PRADO DE SOUZA

**MICROBIOTA *TERROIR* EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DA
MICRORREGIÃO DO SERRO: SEGURANÇA E QUALIDADE**

LAVRAS - MG

2019

THALISSA PRADO DE SOUZA

**MICROBIOTA *TERROIR* EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO
DO SERRO: SEGURANÇA E QUALIDADE**

Dissertação apresentado a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

Coorientador

Dr^a. Suzana Reis Evangelista

Coorientadora

LAVRAS – MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Thalissa Prado de.

Micobiota *terroir* em Queijo Minas Artesanal da microrregião
do Serro: segurança e qualidade / Thalissa Prado de Souza. - 2019.
71 p. : il.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

Coorientador(a): Suzana Reis Evangelista, Luiz Ronaldo de
Abreu.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Queijo artesanal. 2. Micobiota. 3. Identificação. I. Batista,
Luís Roberto. II. Evangelista, Suzana Reis. III. Abreu, Luiz
Ronaldo de. IV. Título.

THALISSA PRADO DE SOUZA

**MICROBIOTA *TERROIR* EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO
DO SERRO: SEGURANÇA E QUALIDADE**

Dissertação apresentado a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2019.

Prof^a. Dr^a. Michelle Ferreira Terra Ematne IFNMG

Prof^a. Dr^a. Sara Maria Chalfoun de Souza EPAMIG



Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

*A toda minha família, em especial
minha mãe Valéria, meu pai
Wander e minha irmã Tamirys que
me apoiaram e foram fundamentais
nesta conquista.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, pelas oportunidades, e que em momento algum me abandonou.

Agradeço especialmente aos meus pais Wander e Valéria e à minha irmã Tamirys, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado. À FAPEMIG e ao CNPq.

Ao professor Luís Roberto Batista pela oportunidade, orientação e pelos muitos ensinamentos.

Às pesquisadoras Suzana Evangelista e Fabiana Passamani pela amizade, paciência e orientação em todos os momentos.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, pela disponibilidade e apoio. À Cleuza, do Laboratório de Laticínios pela colaboração na execução deste projeto.

Aos produtores de Queijo Minas Artesanal do Serro pela receptividade e confiança.

Aos amigos do Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos, pela amizade, ajuda, e boas risadas nos cafés da tarde.

A todos os meus amigos, pelo ombro amigo que sempre dispuseram quando precisei. Em especial à Aline, Suelen, Renan, Marina, Lindaura, Daniela, Rosalra, Antônio Carlos, Luiz Augusto e Iruam pelos grandes momentos compartilhados e por tornarem essa jornada mais agradável.

Aos professores e funcionários da UFLA pelos ensinamentos e auxílio.

A todos vocês, minha sincera gratidão!

RESUMO GERAL

Os queijos artesanais são reconhecidos por sua importância socioeconômica em diferentes países. No Brasil, o Estado de Minas Gerais, é reconhecido como maior produtor do país. Essa região compreende algumas microrregiões produtoras dos conhecidos Queijos Minas Artesanais (QMA) sendo elas: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado e Serro. São produzidos (sem condições controladas) a partir de leite de vaca cru e culturas de soro natural como iniciantes (microrganismos nativos), gerando um produto de sabor único devido as particularidades de seu *terroir*. Como se sabe, os representantes de sua microbiota *terroir* estão associados à produção de certos compostos que impulsionam o processo de maturação, desenvolvendo as características organolépticas que irão determinar o sabor e a qualidade deste queijo. Essa microbiota, abrange um complexo ecossistema que irá determinar a tipicidade deste queijo. Tendo em vista o deficiente conhecimento a respeito da biodiversidade encontrada nesses produtos e ainda, a falta de compreensão sobre as mudanças que esses grupos microbianos sofrem ao longo do ano, esse trabalho teve como objetivo determinar a micobiota *terroir* (leveduras e fungos filamentosos) do ambiente das câmaras de maturação e dos QMA em 3 propriedades da microrregião do Serro-MG, bem como avaliar suas características físico-químicas. A identificação dos fungos foi dada pela análise do perfil proteico por MALDI-TOF MS e identificação fenotípica. No ambiente de maturação identificou-se predominantemente a levedura *Trichosporon japonicum*. Já os fungos filamentosos prevaleceram os gêneros *Penicillium*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium* e *Complexo Cladosporium cladosporioides*. No QMA foi identificado apenas leveduras benéficas que contribuem para as características sensoriais do queijo, sendo elas: *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*. Já os gêneros de fungos filamentosos isolados foram: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Complexo Cladosporium cladosporioides*, *Scopulariopsis*, *Geotrichum* e *Alternaria*. Dentre as espécies isoladas, apenas *Geotrichum candidum* pode ser considerado benéfico, contribuindo com as características organolépticas do produto. Nos parâmetros físico-químicos, o percentual de ácido láctico (acidez), foi o único que apresentou diferenças estatísticas significativas. Com este estudo foi possível identificar quais espécies estão relacionadas com o desenvolvimento das características sensoriais e também espécies contaminantes e possivelmente toxigênicas. A descrição da micobiota *terroir* mostrou-se importante, para a avaliação da segurança e qualidade do QMA.

Palavras-chave: Queijo artesanal. Micobiota. Identificação. Preservação.

GENERAL ABSTRACT

Artisanal cheeses are recognized for their socioeconomic importance in different countries. In Brazil, the State of Minas Gerais is recognized as the country's largest producer. This region comprises some microregions producing the well-known Queijo Minas Artesanais (QMA): Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado and Serro. They are produced (without controlled conditions) from raw cow's milk and natural whey cultures as beginners (native micro-organisms), generating a product of unique flavor due to the particularities of its *terroir*. As is known, the representatives of its *terroir* microbiota are associated with the production of certain compounds that boost the maturation process, developing the organoleptic characteristics that will determine the taste and quality of this cheese. This microbiota encompasses a complex ecosystem that will determine the typicity of this cheese. In view of the lack of knowledge about the biodiversity found in these products and the lack of understanding of the changes that these microbial groups suffer during the year, this work aimed to determine the mycobiota *terroir* (yeasts and filamentous fungi) of the environment of the maturation chambers and the QMA in 3 properties of the Serro-MG microregion, as well as to evaluate their physicochemical characteristics. The identification of the fungi was given by the analysis of the protein profile by MALDI-TOF MS and phenotypic identification. In the environment of maturation was identified the yeast *Trichosporon japonicum* predominantly. However, the filamentous fungi prevailed in the genus *Penicillium*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium* and *Cladosporium cladosporioides* Complex. In the QMA, only beneficial yeasts that contribute to the sensorial characteristics of the cheese were identified: *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* and *Yarrowia lipolytica*. The genus of isolated filament fungi were: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium cladosporioides* complex, *Scopulariopsis*, *Geotrichum* and *Alternaria*. Among the species isolated, only *Geotrichum candidum* can be considered beneficial, contributing with the organoleptic characteristics of the product. In the physical-chemical parameters, the percentage of lactic acid (acidity) was the only one that presented significant statistical differences. With this study it was possible to identify which species are related to the development of sensorial characteristics and also contaminating and possibly toxigenic species. The description of the mycobiota *terroir* was important for the evaluation of the safety and quality of the QMA.

Keywords: Artisanal cheese. Mycobiota. Identification. Preservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Estado de Minas Gerais representando as cinco microrregiões reconhecidas pela EMATER e cadastradas no IMA, para a produção de Queijo Minas Artesanal.....	13
Figura 2 - Mapa da microrregião do Serro, com destaque para os 10 municípios produtores.....	14
Figura 3 - Fluxograma de produção de Queijo Minas Artesanal do Serro	15
Figura 4 - Principais fatores bióticos e abióticos na produção de micotoxinas.....	21
Figura 5 - Amostras de QMA da propriedade 1 da microrregião do Serro-MG.....	34
Figura 6 - Câmara de maturação de QMA da propriedade 2 da microrregião do Serro-MG...	35
Figura 7 - Modelo esquemático de preparo da amostra para técnica de diluição seriada.....	36
Figura 8 - Dendograma dos isolados de levedura presentes no ar das câmaras de maturação das propriedades 1 e 3 do Serro.....	42
Figura 9 - Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes no ar da câmara de maturação da propriedade 1 do Serro.....	43
Figura 10 - Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes no ar da câmara de maturação da propriedade 2 do Serro.....	44
Figura 11 - Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes no ar da câmara de maturação da propriedade 3 do Serro.....	45
Figura 12 - Frequência de fungos filamentosos e leveduras presentes na superfície dos queijos (Swab) e nas câmaras de maturação da propriedade 1 (Ar1), propriedade 2 (Ar2) e propriedade 3 (Ar3) produtoras de QMA do Serro.....	46
Figura 13 - Dendograma dos isolados de levedura presentes na propriedade (A1) de QMA do Serro.....	48
Figura 14 - Dendograma dos isolados de levedura presentes na amostra 2 de QMA do Serro.....	50
Figura 15 - Dendograma dos isolados de levedura presentes na amostra 3 de QMA do Serro.....	51
Figura 16 - Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes na amostra 1 de QMA do Serro.....	52
Figura 17 - Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes na amostra 2 de QMA do Serro.....	53
Figura 18 - Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes nas amostras 1, 2 e 3 de QMA do Serro.....	54
Figura 19 - Análise de Componentes Principais (PCA) da diversidade micológica e sua correlação com as características físico-químicas das amostras A1, A2 e A3 de QMA do Serro.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenadas geográficas de três propriedades de QMA da microrregião do Serro-MG, onde foram feitas as coletas.....	34
Tabela 2 - Legenda para os valores de score gerados pelo MALDI-TOF MS.....	39
Tabela 3 - Contagem da População Total (Fungos Filamentosos e Leveduras) presente no ar das câmaras de maturação de 3 propriedades produtoras de QMA do Serro-MG...	42
Tabela 4 - População da microbiota total e média (UFC/g) nos meios DG18, YEPG e DRBC, presente nas amostras compostas de QMA nas 3 propriedades avaliadas.....	47
Tabela 5 - População da microbiota presente nas amostras das 3 propriedades produtoras de QMA.....	49
Tabela 6 - Composição físico-química e espessura da casca de 3 amostras de QMA do Serro (valor médio \pm desvio padrão) das 3 propriedades correspondente a casca e a massa dos queijos.....	55

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	12
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Queijo Minas Artesanal produzido na microrregião do Serro-MG.....	13
2.2 Processo de produção e maturação do Queijo Minas Artesanal.....	15
2.3 Microbiota <i>terroir</i> e influência no processo de produção e maturação do QMA.....	17
2.4 Fungos Filamentos e micotoxigênicos no processo de maturação.....	20
2.5 Metodologias utilizadas para a identificação da microbiota.....	22
2.6 Legislação referente a maturação de Queijo Minas Artesanal.....	23
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2 - Micobiota <i>terroir</i> em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro: segurança e qualidade.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1 Amostragem.....	34
2.2 Quantificação da micobiota do ar das câmaras de maturação da microrregião do Serro-MG.....	35
2.3 Quantificação da micobiota do QMA da microrregião do Serro-MG.....	36
2.4 Purificação e Identificação dos isolados.....	36
2.4.1 Identificação por MALDI-TOF MS.....	37
2.5 Avaliação do potencial toxigênico de fungos filamentosos.....	39
2.6 Análises físico-químicas.....	40
2.6.1 Acidez.....	40
2.6.2 Cloreto de Sódio.....	40
2.6.3 pH.....	40
2.6.4 Umidade.....	40
2.6.5 Gorduras.....	41
2.7 Análise estatística.....	41
3. RESULTADOS.....	42
3.1 Avaliação da micobiota <i>terroir</i> presente no ar das câmaras de maturação do Queijo Minas Artesanal e na superfície do queijo (Swab).....	42
3.2 Avaliação da micobiota <i>terroir</i> presente no Queijo Minas Artesanal do Serro através de diluição seriada.....	46
3.3 Análises físico-químicas do Queijo Minas Artesanal do Serro.....	55
3.4 Análise de Componentes Principais (PCA).....	56
4. DISCUSSÃO.....	58
5. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, embora todo o Estado de Minas Gerais tenha habilidade para a produção de queijos artesanais, o Queijo Minas Artesanal (QMA) é produzido em cinco microrregiões, sendo elas: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serro. Esses são fabricados a partir de leite de vaca cru e culturas de soro natural como iniciantes (microrganismos nativos), gerando um produto de sabor único devido as particularidades de seu *terroir*. Como se sabe, na fabricação destes queijos, a maturação é a etapa final e crucial para o estabelecimento das características sensoriais típicas do produto. Nesse processo, a presença e ação dos microrganismos envolve transformações bioquímicas associados à produção de certos compostos que impulsionam o processo de maturação, desenvolvendo as características organolépticas que irão determinar o sabor e a qualidade deste queijo (BEMFEITO, 2016, BONY, 2015, HARBUTT, 2010, EMATER, 2019; FOX, 1998).

Pelo fato deste queijo ser produzido e maturado artesanalmente, sem condições controladas, torna-o sujeito a contaminação por microrganismos presentes no ambiente e na matéria prima característicos de seu *terroir* (SANTOS, 2010). *Terroir* é uma palavra de origem francesa, intraduzível, e está relacionada ao território e ao ambiente particular de uma região o que irá expressar a qualidade, tipicidade e identidade de um produto (TONIETTO, 2007). A microbiota *terroir* podem agir de forma a contribuir com sabor agradável do queijo. Porém, existe a possibilidade de contaminação por representantes toxigênicos ou ainda patogênicos (SANTOS, 2010).

Um dos grandes desafios atuais é obter uma visão clara do perfil microbiológico presente durante a produção e maturação do QMA, e sua influência nas características físico-químicas e sensoriais destes queijos. E ainda compreender a relação das mudanças que esses grupos microbianos sofrem ao longo do ano, em decorrência de variações sazonais, e consequentemente alteração na composição do QMA (BONY, 2015; FIGUEIREDO, 2014; SOBRAL, 2017).

Tendo em vista, o deficiente conhecimento a respeito da biodiversidade encontrada nesses produtos, este trabalho tem por objetivo determinar a micobiota *terroir* (leveduras e fungos filamentosos) presentes no ambiente das câmaras de maturação e no QMA, produzido durante o período de inverno na microrregião do Serro-MG, bem como avaliar suas características físico-químicas.

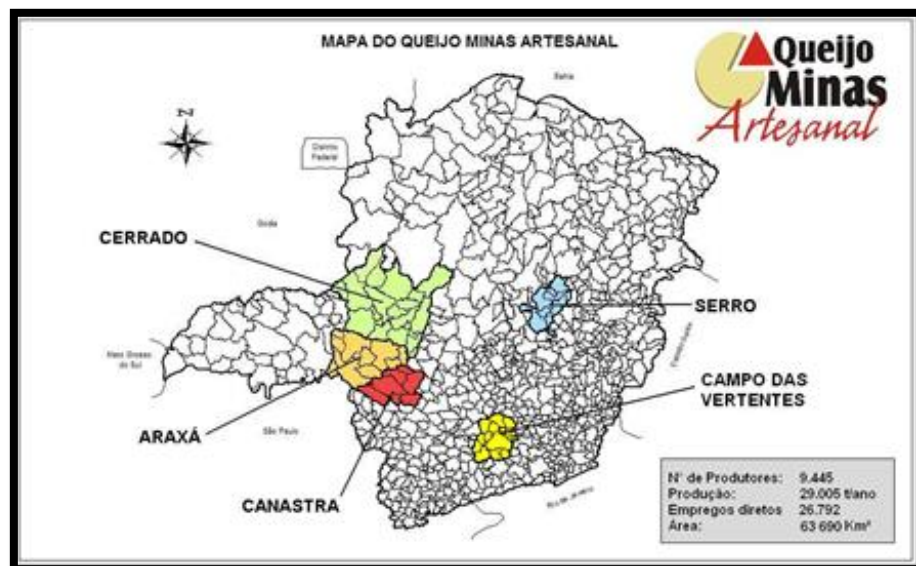
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Queijo Minas Artesanal produzido na microrregião do Serro-MG

No Brasil, embora todo o Estado de Minas Gerais tenha habilidade para a produção de queijos artesanais, o Queijo Minas Artesanal (QMA) é produzido em cinco microrregiões (Figura 1) reconhecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER) e cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), sendo elas: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serro (EMATER, 2019).

Nessas microrregiões, a produção do Queijo Minas Artesanal se trata de um fator cultural de grande importância socioeconômica para a agricultura familiar. Estima-se que sua produção compreenda cerca de 9.445 produtores, que fabricam por volta de 29 mil toneladas de queijo por ano, e conseqüentemente gera por volta de 27 mil empregos (EMATER, 2019). Particularmente a região do Serro, de acordo com EMATER, no ano de 2019, dos 881 produtores de QMA nessa região, apenas 262 estão devidamente registrados pelo IMA (ORDÓNEZ, 2005; EMATER, 2019; BEMFEITO, 2016; IMA, 2019).

Figura 1 - Mapa do Estado de Minas Gerais representando as cinco microrregiões reconhecidas pela EMATER e cadastradas no IMA, para a produção de Queijo Minas Artesanal.



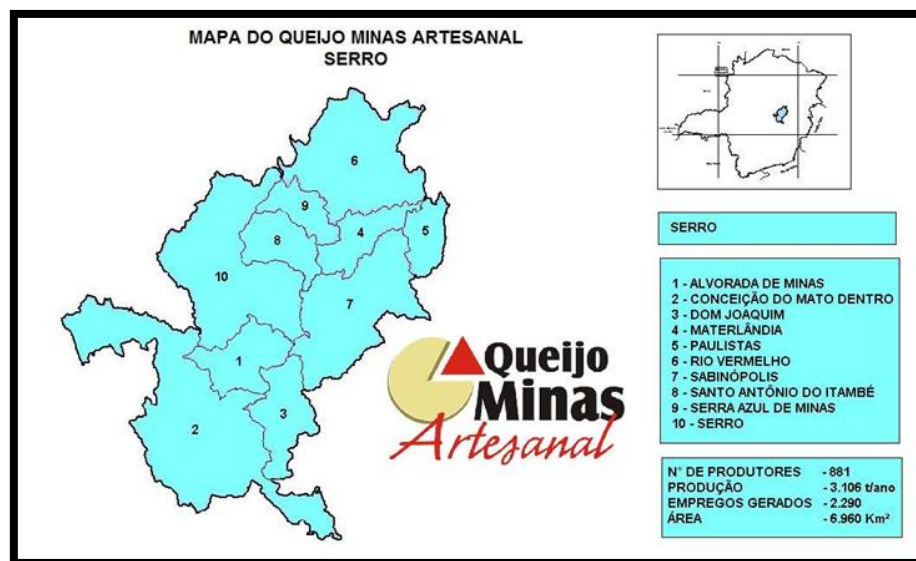
Fonte: EMATER (2019).

A microrregião do Serro está localizada no Vale do Jequitinhonha em uma região montanhosa na vertente oriental da Serra do Espinhaço e da Estrada Real, entre os paralelos 18° e 19° de latitude Sul, no Estado de Minas Gerais (EMATER, 2019). O clima é classificado como temperado úmido, com temperatura média anual de 20.5 °C, com média mínima de 17.3 °C e máxima de 23.2 °C. Apresenta um período seco no inverno e um verão úmido, com índices

pluviométricos médio anual de 1.471 mm, sendo o mês de Agosto o mais seco, com precipitação de 8mm, e a maior precipitação no mês Dezembro de 337mm (CLIMATE-DATA.ORG, 2019).

Esses fatores climáticos, assim como, o tipo de solo, altitude, pastagem e a própria água, são algumas das razões pelas quais o queijo produzido em cada região é tão particular, como ocorre com o queijo do Serro que é produzido apenas nessa microrregião (Figura 2), que compreende 10 cidades produtoras (SILVA et al., 2013). A qualidade e o sabor dessa iguaria típica da região levaram o produto a ser reconhecido pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), em dezembro de 2011. E assim, a microrregião do Serro passou a ser reconhecida, com certificação de Indicação Geográfica (IG), conquistando o título de produtor exclusivo desse tipo de queijo (MEDEIROS, 2015). A IG é uma ferramenta importante, de proteção da origem. Seu registro, destaca o produto como o QMA no mercado, agregando valor às regiões e diferenciando-o no mercado consumidor. Além de controlar a produção, garantindo a rastreabilidade, em decorrência de suas características geográficas, socioculturais e históricas (INPI, 2011).

Figura 2 - Mapa da microrregião do Serro, com destaque para os 10 municípios produtores.



Fonte: EMATER(2019).

De acordo com Harbutt (2010), essa certificação reconhece a particularidade de cada alimento feito tradicionalmente, sendo, portanto, o resultado de uma complexa interação entre, solo, planta e clima, que quando combinados com métodos de produção e matérias primas, não pode ser reproduzida em nenhum outro lugar.

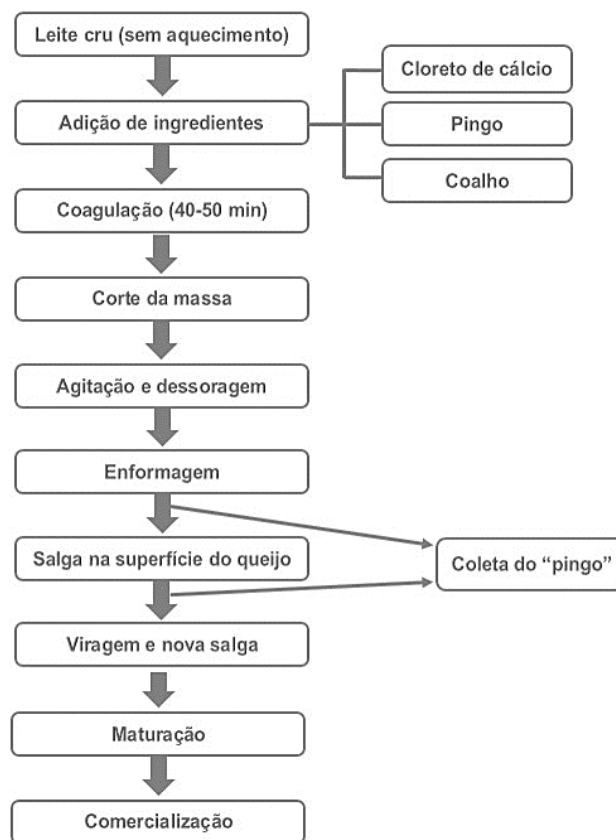
Portanto, a certificação de origem de um queijo identifica seu *terroir*, que é uma palavra francesa que não tem tradução e está relacionada ao ambiente particular de uma região o que

irá expressar a qualidade, tipicidade e identidade de um produto (TONIETTO, 2007, HARBUTT, 2010).

2.2 Processo de produção e maturação do Queijo Minas Artesanal

É considerado Queijo Minas Artesanal somente aquele que mantém as características de produção tradicional, a partir de mão de obra familiar, com mínima mecanização e produção em baixa escala, utilizando o leite cru, sem tratamento térmico (KUPIEC, 1998). Os QMAs, assim como os produzidos na microrregião do Serro, são fabricados a partir de leite de vaca cru (sem tratamento térmico) e culturas de soro natural como iniciantes. Este inóculo endógeno, rico em microrganismos nativos, denominado “pingo”, consiste no soro coletado após a prensagem do queijo do dia anterior, e adicionado ao leite cru junto com o coalho, sal e cloreto de cálcio, como pode ser visto no fluxograma de produção (Figura 3). Sabe-se que o “pingo” varia de acordo com as particularidades da região, conseqüentemente, resulta em um QMA com diferentes características, o que os tornam tão peculiares (MACHADO, 2004).

Figura 3 - Fluxograma de produção de Queijo Minas Artesanal do Serro-MG.



Fonte: Adaptado de Machado (2004).

A maturação é a etapa final da fabricação dos QMAs, sendo crucial para o estabelecimento das características sensoriais típicas do produto. Nesse processo, ocorre uma

complexa interação de fatores de ordem biológica, química e bioquímica que agem modificando as propriedades físico-químicas da massa do queijo, influenciando a textura, consistência e formando compostos que serão responsáveis pelo desenvolvimento dos sabores e aromas característicos de cada variedade (FOX, 1998). Como se sabe, não só o processo de fabricação em si, mas o período de maturação promove diferenças sensoriais significativas, além de criar um ambiente inóspito para microrganismos patogênicos (BONY, 2015; DINIZ, 2013). Durante a maturação, ácidos orgânicos gerados pela fermentação microbiana da lactose, assim como a redução do pH, devido a produção de ácidos, tem contribuído para a redução e/ou eliminação de possíveis patógenos contaminantes, tornando o queijo artesanal mais seguro (NERO *et al.*, 2008; BRANT, 2007).

O IMA então definiu para a microrregião do Serro um período mínimo de 17 dias de maturação em temperatura ambiente, para garantir a segurança do produto de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela Lei 14.185 de Janeiro de 2002 (MINAS GERAIS, 2002). No entanto, apesar da maturação contribuir para a eliminação de microrganismos patogênicos, não deve ser utilizada para resolver falhas sanitárias na produção do leite cru e dos queijos, mas proporcionar o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis ao produto final (FIGUEIREDO, 2015).

Os fatores determinantes na tipicidade dos queijos maturados são influenciados pelas condições ambientais a qual são submetidos os queijos, tais como: umidade relativa, temperatura e fatores intrínsecos ao queijo como: pH, teor de NaCl e umidade da massa. Esses fatores interferem tanto no aspecto físico-químico, quanto microbiológico, ocasionalmente levando a seleção da microbiota que irá atuar na superfície e no interior da massa do queijo. Assim são determinadas as características organolépticas do produto, de maneira a torná-los mais apreciáveis ou não (BANK, 1998; BONY, 2015; FIGUEIREDO, 2014; SOBRAL, 2017). Trata-se de um fenômeno complexo, uma vez que pode variar de queijo para queijo, com a geração de diferentes componentes como: aminoácidos, ácidos graxos, ésteres, aminas, ácidos orgânicos, dióxido de carbono, dentre outros. Em função disso, o tempo de maturação varia para cada tipo de queijo (KATZ, 2014; PERRY, 2004; BEHMER, 1985; FOX, 1993).

Os eventos bioquímicos ocorrem no queijo proporcionando sucessivas alterações ao longo da maturação, agindo principalmente no catabolismo de macromoléculas como a lactose, caseína e lipídeos (MCSWEENEY, 2004). Essas vias metabólicas são divididas em eventos primários e secundários. Dentre os eventos primários temos a fermentação da lactose, a lipólise; a proteólise, e ainda o catabolismo do lactato e citrato (FOX, 1998).

A lactose é um dissacarídeo, podendo ser hidrolisada pela via glicolítica ou por vias enzimáticas, bactérias lácticas, na qual é produzido o L-lactato ou o D-lactato. O lactato gerado contribui para o aumento da acidez titulável, reduzindo o pH. O desenvolvimento da microbiota secundária tende a reduzir a acidez do queijo ao longo na maturação, ao consumir o ácido láctico por vias oxidativas, produzindo ainda, CO₂ e água. Esta redução na acidez favorece o desenvolvimento de outras culturas microbianas sensorialmente benéficas ao queijo (MCSWEENEY, 2004; MCSWEENEY; SOUSA, 2000).

O catabolismo dos lipídeos (lipólise) ocorre até a formação de ácidos graxos, em sua maioria ácidos graxos de cadeia curta, que quando na forma livre é capaz de gerar compostos voláteis aromáticos. O catabolismo da caseína (proteólise) gera peptídeos de baixa massa molecular e aminoácidos. Peptídeos de cadeia curta são responsáveis pelo sabor amargo no queijo e os aminoácidos contribuem para a formação de sabor e aroma desejáveis (MCSWEENEY, 2000; FOX, 1998; MCSWEENEY, 2004).

Além disto, o catabolismo da caseína em moléculas menores (peptídeos e aminoácidos), resulta na redução da atividade de água (A_w) dos queijos, pela ligação entre a água livre e os grupamentos amino formados durante a proteólise (MCSWEENEY, 2004). A redução da atividade de água desempenha um importante papel, no controle do crescimento de bactérias patogênicas, contribuindo positivamente para a qualidade de queijos, como o QMA (DORES, 2012).

A proteólise é considerada a via mais complexa observada durante o processo de maturação, podendo ser catalisada pela enzima plasmina, naturalmente presente no leite cru, e também por proteinases e peptidases provenientes de bactérias do ácido láctico e de outros organismos presentes no queijo. Já as reações secundárias, são representadas pelo metabolismo dos ácidos graxos e aminoácidos (FOX, 1998; MCSWEENEY, 2004)

2.3 Microbiota *terroir* e influência no processo de produção e maturação do QMA

O queijo do Serro como se sabe, é uma das variedades de Queijo Minas Artesanal, sendo fabricado tradicionalmente dessa forma por décadas. Esse queijo é feito empregando culturas de soro natural como iniciantes (Bactéria do ácido láctico indígena) e coalhada comercial. O iniciador natural, também denominado “pingo” é então composto pelo soro de leite no qual está presente uma microbiota diversificada, podendo apresentar espécies de *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* (BORELLI, 2006). Esse soro-fermento é composto por culturas lácticas, que estão entre os responsáveis pelas diferentes características sensoriais apresentadas

pelo queijo artesanal. Portanto, a composição desse “pingo” é característico de cada região produtora, podendo variar até mesmo entre produtores da mesma região (LEITE, 1993).

As bactérias do ácido-lácticas (LAB) presentes no “pingo” são representantes de microrganismos desejáveis. Entretanto, microrganismos deterioradores ou patogênicos podem estar presentes nos queijos, em função de alguma contaminação por higienização deficiente durante o processo de produção, desde a obtenção do leite até o consumo do próprio queijo (GUEDES NETO, 2004). Por isso, existe um grande interesse nos estudos relacionados ao conhecimento da microbiota presente nestes queijos, uma vez que a quantidade e a diversidade encontrada é resultante da qualidade do leite, da temperatura e umidade em que estão submetidos, além principalmente, da exposição à microrganismos durante e após todo processo de produção (BERESFORD, 2001; OGIER, 2002; TORKAR, 2006; IRLINGER, 2009).

Em um estudo realizado por Perin (2017) avaliou-se a composição da diversidade microbiana de bactérias do ácido láctico (LAB) de uma variedade de Queijos Minas Artesanal produzidos no Serro, Canastra, Serra do Salitre, Araxá e Campos das Vertentes. Neste estudo, foi observado que o gênero predominante foi *Lactobacillus spp.* em todas as cinco variedades de queijo artesanal. Esse resultado já era esperado visto que espécies do gênero *Lactobacillus* são capazes de crescer sob as seletivas condições existentes em queijos, como baixo pH e altas concentrações de sal.

Durante o processo de produção e maturação, culturas coadjuvantes que surgem representadas por fungos, leveduras e bactérias de ácido propiônico (PAB), são importantes e influenciam diretamente no processo. As bactérias PAB podem ser anaeróbicas ou anaeróbicas facultativas, e utilizam o ácido láctico produzido pelas culturas iniciantes, gerando ácido propiônico, ácido acético e CO₂, responsável pela formação de furos “olhaduras” nos queijos. Essas olhaduras se formam normalmente quando o queijo apresenta entre 20 a 40 dias de maturação e ocorre a uma temperatura em média de 18°C a 22°C, sendo mais acentuada no centro do queijo por apresentar um menor teor de sal (FURTADO, 1991).

As leveduras emergiram como organismos significativos no processo de maturação do queijo. Muitos estudos têm demonstrado a ocorrência de leveduras ligada a processos de maturação em diferentes queijos. Leveduras como *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*, podem auxiliar as culturas iniciais por atividade proteolítica e lipolítica, participando do processo de maturação e estabelecimento do aroma. Embora ainda existam representantes de leveduras que levam a deterioração do produto, através da produção de gás, descoloração e mudanças na textura do queijo (BORELLI, 2006).

Investigações da composição da diversidade de leveduras isoladas da superfície de queijos revelaram uma grande diversidade, com mais de 10 espécies das quais *Geotrichum candidum* foi uma das mais frequentes (BOUTROU, 2005).

O *G. candidum* é uma espécie anamorfa, encontrada em vários habitats como solo, planta, e também está naturalmente presente no leite cru, sendo encontrada em 17% a 40% das amostras. Assim, se estiverem presentes no leite cru, conseqüentemente estarão em queijos que utilizem desse leite para sua fabricação, independente da origem do leite utilizado (vaca, ovelha ou cabra). Essa espécie começa a se desenvolver no início do processo de maturação, na superfície do queijo, contribuindo para o desenvolvimento de típicos sabores do queijo (BOUTROU, 2005). Embora geralmente apresente pouca atividade proteolítica, as suas lipases são responsáveis pelo aparecimento dos precursores de vários compostos voláteis, tais como álcoois, ácidos graxos, metil cetonas, lactonas e éteres, que conferem propriedades organolépticas agradáveis (SACRISTÁN, 2012).

O leite cru também fornece condições e nutrientes essenciais para o crescimento de uma grande diversidade de espécies de fungos filamentosos. Esses fungos apresentam um papel benéfico associado a fabricação de uma variedade de queijos. Sendo assim, o seu principal papel está relacionado com a melhoria do sabor e aroma, modificando o corpo e a estrutura do queijo. É muito conhecido o *Penicillium camemberti*, que cresce na superfície do queijo, tendo grande importância na produção do queijo Camembert e Brie, e ainda, o *Penicillium roquefordi*, que cresce dentro do queijo, importante na produção do queijo Roqueford e Gorgonzola (WOUTERS, 2002; DELAVENNE, 2011).

Pangallo (2014), em seu estudo, avaliou a diversidade microbiana de queijos Bryndza produzidos em Maio. Assim como o QMA, esse queijo é produzido por leite não pasteurizado, entretanto é feito a partir do leite de ovelha. É um típico queijo produzido na Eslováquia, no início da temporada de verão, onde a estação influencia positivamente na qualidade do queijo, assim como a atividade e composição da microbiota dominante naquela estação. Quanto à presença de fungos filamentosos foram observadas predominantemente espécies do gênero *Penicillium* e espécies de vários outros gêneros, dentre as quais estão: *Cladosporium cladosporioides* e *Beauveria brongniartii*. A diversidade de bactérias englobou espécies pertencentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* e em menor incidência espécies de *Pseudomonas*. Em relação às leveduras, observou-se predominância de espécies do gênero *Candida* e também diversas espécies entre as quais se encontram: *Debaryomyces hansenii*, *Galactomyces candidus*, *Galactomyces geotrichum*, sendo esta última espécie considerada o estado teleomórfico de *G. candidum* (POTTIER, 2008).

Em outro estudo realizado por Banjara (2015) foi avaliado a diversidade de espécies de leveduras e fungos filamentosos presentes em diferentes variedades de queijos produzidos em vários países. Ao todo foram avaliados 44 tipos de queijos, sendo identificado identificou-se, em 79% de todos os queijos, a espécie de levedura *Debaryomyces hansenii*, e ainda foram encontras também *Galactomyces candidus*, algumas espécies do gênero *Candida*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia kudriavzevii*, e *Yarrowia lipolytica*. Já na avaliação referente aos fungos filamentosos, observou-se predominância da espécie *Penicillium roqueforti*. E com menor incidência foram isoladas outras 16 espécies de fungos, dentre as quais se encontram *P. camemberti*, *P. verrucosum* e *Aspergillus niger*. Embora não predominantes, algumas espécies foram identificadas relacionadas com produção de toxinas como *A. flavus*, e um patógeno humano conhecido que é a *Candida parapsilosis*.

Claramente, o sabor do queijo maturado é um equilíbrio delicado de vários compostos, produzidos por uma sucessão de microrganismos, em que cada um executa sua atividade particular. A seleção de culturas iniciadoras concomitantes também são cruciais para agregar qualidade e sabor (WOUTERS, 2002).

2.4 Fungos Filamentos e micotoxigênicos no processo de maturação

Os fungos são frequentemente adicionados a certas variedades de queijo para proporcionar uma aparência, consistência e sabor característicos, e prolongar a vida útil. No entanto, nem todos os fungos que estão presentes são benéficos. Algumas espécies que contaminam o queijo, ou podem estar presentes no leite estão associadas com a produção de micotoxinas de grande risco para a saúde (BANJARA, 2015).

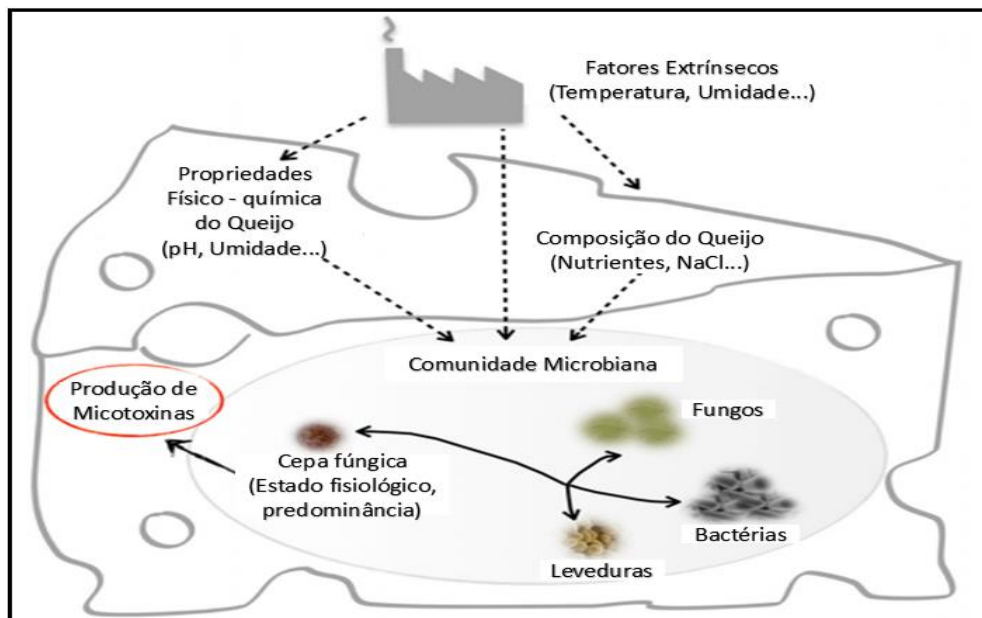
As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por diferentes gêneros de fungos, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. A principal toxina encontrada no leite é a Aflatoxina M1, que é derivada da Aflatoxina B1 produzida por três espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*. Dentre diferentes tipos de aflatoxinas existentes, as aflatoxinas M1 e M2, podem ser encontradas em queijos em decorrência da utilização de leite contaminado. Pode ser visto pela literatura vários trabalhos demonstrando a presença de M1 em vários tipos de queijos de diversas origens. Vale ressaltar que mesmo que o queijo seja pasteurizado, a temperatura não consegue eliminar as aflatoxinas que estiverem presentes, por serem termostáveis. A aflatoxina mais tóxica é a B1, sendo classificada como composto cancerígeno do grupo 1, assim como a aflatoxina M1, por ser metabolitos hidroxilados de aflatoxina B1, porém menos tóxica (FONTAINE, 2015; ÖZGÖREN, 2016).

Assim, a contaminação pela aflatoxina M1 em produtos lácteos, como o queijo, resulta da contaminação indireta do leite. Na verdade, a B1 contamina a alimentação que é mais consumida por animais lácteos. Em consequência a aflatoxina B1 é metabolizada em M1 no fígado do animal e depois excretado no leite (FONTAINE, 2015). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou em 18 de Fevereiro de 2011, por meio da RDC nº 7 que o limite máximo tolerado de aflatoxina M1 em queijos é de 2,5 µg/kg (BRASIL, 2011).

Um alimento ou matéria prima pode apresentar múltiplas micotoxinas, devido à capacidade de algumas espécies de fungos de produzi-las, ou ainda pela potencial contaminação com diferentes espécies de fungos micotoxigênicos (FONTAINE, 2015).

No entanto, a produção de micotoxinas pode mudar sob diferentes fatores bióticos e abióticos (Figura 4). Os principais fatores abióticos podem ser divididos em fatores ambientais e de produção, podendo ser intrínseco, como a composição físico-química do queijo (pH, atividade de água (A_w) e teor de NaCl) ou ainda a sua própria composição (fontes de carbono e nitrogênio). E os fatores extrínsecos, incluem temperatura, umidade relativa, atmosfera de armazenamento, tempo de maturação, e ainda fatores bióticos como as interações microbianas (HIMERY, 2014).

Figura 4- Principais fatores bióticos e abióticos na produção de micotoxinas.



Fonte: Adaptado de Himery (2014).

2.5 Metodologias utilizadas para a identificação da microbiota

Atualmente um dos grandes desafios para os microbiologistas sobre a microbiota de queijos é obter uma visão clara da diversidade de microrganismos que estão presentes. Como visto, essa microbiota afeta diretamente a qualidade do produto, e torna-se importante a identificação e caracterização com precisão. Existe uma ampla gama de técnicas que tem sido utilizada, e são divididas em três grupos: métodos que dependem de cultivo seguido de caracterização fenotípica; métodos que dependem do cultivo seguido por caracterização molecular; e métodos que dependem somente da caracterização molecular (independente de cultivo). Todos esses métodos possuem vantagens e desvantagens associadas, sendo, portanto interessante uma associação de métodos (BERESFORD, 2001).

A microbiologia clássica do queijo depende exclusivamente da primeira abordagem (BERESFORD, 2001), na qual os microrganismos podem ser identificados morfolologicamente e por testes bioquímicos empregando diferentes meios de cultivo. Padrões de cultivo já são preconizados para identificação de bactérias como os descritos no “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (HOLT, 1994), leveduras segundo Barnett (2000) e fungos filamentosos como descritos por Booth (1971), Nelson (1983), Barnett (1987), Klich (2002), Pitt (1997) e Samson (1995). No entanto, neste tipo de metodologia apenas espécies que crescem sob as condições seletivas poderão ser caracterizadas fenotipicamente, sendo estes dependentes da cultura e condições ambientais utilizadas no ensaio (BERESFORD, 2001).

A aplicação de técnicas moleculares para caracterizar microrganismos supera diversos problemas associados à caracterização fenotípica. Os métodos mais utilizados envolvem a caracterização de ácido nucleico ou proteínas, análise de ácidos graxos, parede celular e membrana antigénica (BERESFORD, 2001).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica muito empregada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e elucidar a estrutura e as propriedades químicas das moléculas. Basicamente, esta técnica consiste na ionização de átomos ou moléculas de uma amostra, gerando a separação destes átomos ou moléculas em função da sua relação massa/carga (m/z), a fim de possibilitar sua identificação e quantificação (GOULART, 2013).

Diferentes abordagens desta técnica, baseadas em vários sistemas de ionização e detecção, têm sido desenvolvidas. Atualmente, é considerado um dos métodos mais amplamente utilizados para a análise de gestão de doenças infecciosas possibilitando a identificação dos microrganismos. Essa técnica consiste na ionização por dessorção a laser

assistida por matriz, cuja sigla em inglês é MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, sigla TOF (do inglês *Time of flight*) (GOULART, 2013). Muitos laboratórios tem empregado esta técnica para avaliação microbiológica de amostras devido à sua eficiência e ainda pelo menor custo para as análises. Mas para isso, esse sistema de identificação requer culturas puras, pois uma mistura de espécies é mais complexa para uma identificação precisa. Além disso, a atualização do banco de dados é essencial, para possibilitar a identificação a nível de espécie com altos scores, garantindo uma alta confiabilidade nas análises (CHAKRABARTI, 2016).

2.6 Legislação referente a maturação de Queijo Minas Artesanal

A primeira regulamentação sobre os Queijos Minas Artesanal ocorreu em 2000, por meio da Resolução Nº 7 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelecendo-se que a comercialização de queijos fabricados a partir de leite cru seria permitida e regularizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), desde que o produto fosse submetido há um tempo mínimo de 60 dias de maturação (BRASIL, 2000). No entanto, o longo tempo de maturação imposto pela legislação, gerou mobilização dos produtores (ORNELAS, 2005). Os produtores alegaram que o longo período de maturação, comprometeria as características sensoriais tradicionais do queijo, além de aumentar os custos com a estocagem do produto, dificultando assim a comercialização (BRANT, 2003). De fato, é visto que o tempo prolongado de maturação pode descaracterizar o produto (FIGUEIREDO, 2014).

Em 2002, foi regulamentada a lei estadual Nº 14.185 pelo Instituto Mineiro de Agropecuária, específica para os queijos artesanais, que visa controlar e regular a produção e comercialização do QMA de forma segura, em decorrência da importância que esse produto representa para o Estado de Minas Gerais. E assim, foram estabelecidas normas para o processo de produção do QMA, em relação a fabricação, embalagem e transporte (MINAS GERAIS, 2002). Estabeleceu-se ainda a obrigatoriedade do cadastramento oficial das queijarias junto ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), no qual o queijo do Serro está em conformidade. No entanto, o período de 60 dias de maturação foi mantido (DORES, 2012).

Portanto, essa legislação ainda gerava um problema entre os produtores, uma vez que a comercialização do queijo ocorria quando este apresentava em média 20 dias de maturação, ou até menos, dependendo das condições climáticas. Visto que, queijos produzidos a partir de leite cru tendem a ter um tempo de maturação mais rápido em função da própria microbiota existente (CRUZ, 2014; PERRY, 2004). Além de influências climáticas, uma vez que, quanto mais elevada a temperatura e maior a umidade, mais rápido ocorre esse processo (CRUZ, 2014).

Essa situação em determinar o tempo de maturação já foi enfrentada por produtores de outros países, entre os quais a França que possui um grande número de queijos produzidos com leite cru. A solução do impasse veio da implantação de boas práticas de manejo do gado e higiene rigorosa em todas as etapas de produção do queijo, garantindo assim, a qualidade microbiológica do produto e preservando a saúde do consumidor. O mesmo vem sendo empregado em Minas Gerais, visando impedir a contaminação do QMA, na qual os produtores devem cumprir uma série de requisitos sanitários, que incluem a construção de uma estrutura física adequada para a produção, participar de cursos de boas práticas de fabricação e manipulação, manter exames de saúde dos manipuladores atualizados, vacinar o rebanho e realizar exames de sanidade nos animais, e ainda tratar a água de abastecimento da queijaria e realizar análises laboratoriais dos queijos (PERRY, 2004; MINAS GERAIS, 2002).

Portanto, em consequência das controvérsias em relação ao tempo de maturação, foi necessário atribuir critérios adicionais para a elaboração dos QMAs. A partir de uma Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011, os queijos artesanais passaram a ser aceitos para comercialização em períodos inferiores a 60 dias, desde que estudos comprovem a qualidade desse produto, por meio de boas práticas de fabricação. Assim, foi definido pela Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013, diretrizes para a produção do queijo minas, e o IMA definiu para a microrregião do Serro um período mínimo de 17 dias de maturação em temperatura ambiente (IMA, 2019; MINAS GERAIS, 2013).

REFERÊNCIAS

- BANJARA, N.; SUHR, M.J.; HALLEN-ADAMS, H.E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. **Current microbiology**, 70(6), 792-800. 2015.
- BANK, J.M. Cheese. In: EARLY, R. The Technology of Dairy Products. 2.ed. **London. Ralph EARLY**. Cap.3, p.81-122.1998.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4.ed. New York: Library Macmillan Company, 218 p, 1987.
- BARNETT, J.A. et al. **Yeasts: characteristics and identification**. 3.ed. EUA: Cambridge University, 1139 p, 2000.
- BEHMER, M.L.A. Tecnologia do Leite: Produção, Industrialização e análise. 15.Ed. **São Paulo: Ed. Nobel**, 1985.
- BEMFEITO, R.M. Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**.Vol. 99 No. 10, 2016.
- BERESFORD, T.P. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal** 11. 259–274. 2001.
- BONY, E.; STRAUB, C.; et. al. Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. PLoS One 10, e0124360. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>. 2015.
- BOOTH, C. The genus *Fusarium*. Surrey: Commonwealth **Mycological Institute**, 237 p. 1971.
- BORELLI, B.M.; FERREIRA, E.G.; LACERDA, I.C.A. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.22, p.1115-1119, 2006.
- BOUTROU, R. et. al. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International Journal of Food Microbiology**. 102 (2005) 1–20.
- BRANT, L.M.F. **Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas artesanal do Serro – MG**. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 1570–1574, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RDC nº 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966 > agosto de 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução N. 07 de 28 de novembro de 2000. Critérios de funcionamento e de controle da produção de queijarias, para seu relacionamento junto ao serviço de inspeção federal. Brasília: **Ministério da Agricultura**,

Pecuária e Abastecimento, 2000. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em 28 de outubro de 2018.

CHAKRABARTI, A. The Future of Infectious Diseases Diagnostics: MALDI-TOF. **International Journal of Infectious Diseases**. 45S: 1–477. 2016.

CLIMATE-DATA,ORG, 2018. **Dados climáticos para cidades mundiais**. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/>> Acesso em: 03 de janeiro de 2019.

CRUZ, F.T. et al. O debate em torno de queijos feitos de leite cru: entre aspectos normativos e a valorização da produção tradicional. **Vig Sanit Debate**.2(04):34-42. 2014.

DELAVENTE, E.; MOUNIER, M.; ASMANI, K.; JANY, J.L.; BARBIER, G.; LE BLAY, G. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. **International Journal of Food Microbiology** 151.247–251. 2011.

DINIZ, M.F.S. **Queijo Canastra: um estudo envolvendo aspectos culturais e parâmetros de inocuidade do alimento**. Dissertação de mestrado apresentada a Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 2013.

DORES, M.T. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: Ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**. v.2, n.2., p.26-34, Dezembro, 2012.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS.EMATER. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>>. Acesso em: 02 jan. 2019.

FIGUEIREDO, S. P. *et al.* Características do leite cru e do queijo Minas artesanal do Serro em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 68–82, 2015.

FIGUEIREDO, S.P. **Características do leite cru e do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais, e produção de queijos com doces** / Sylvania Pereira de Figueiredo. – Diamantina: UFVJM, 2014. 108 p.

FONTAINE, K. Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined cheeses. **Food Control**. 47: 634-640. 2015.

FOX, P. F. et.al. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Vol 1 – **General aspects**. London U. K. 1993A. Chapman & Hall, 2. Ed. 601 p. 1993.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Chemistry and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London U. K. Blackie Academic & Professional. Cap.10, p.403–418. 1998.

FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1991. 297p.

GOULART, V.A.M. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. **Nanocell News**. Vol. 1, N. 3, 21 de novembro de 2013.

GUEDES NETO, L.G. **Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de *Staphylococcus spp.* e de bactérias ácido-lácticas e de sua atividade**

antagonista in vitro. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

HARBUTT, J. (Org). O livro do queijo. **São Paulo: Globo**. 2010. 352 p.

HYMERY, N. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. **Institute of Food Technologists**. Vol 13. 2014.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams Wilkins, 787 p, 1994.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA (IMA). **Queijo Minas Artesanal**. Belo Horizonte. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/certificacao/queijo-minas-artesanal-link>>. Acesso em: setembro de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. SEBRAE (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS). **Guia de implementação de indicações geográficas para produtos**: orientações para o desenvolvimento de projetos para o reconhecimento de uma indicação geográfica no INPI. 86p. Brasília, 2011.

IRLINGER, F.; MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. **Curr Opin Biotechnol** 20:142–148. 2009

KATZ, S.E. A arte da Fermentação: Explore os conceitos e processos essenciais da fermentação praticados ao redor do mundo. 1 ed. **São Paulo: Tapioca**. 2014.

KLICH, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. **Centraalbureau voor schimmelcultures**. 2002.

KUPIEC, B.; REVELL, B. Speciality and artisanal cheeses today: the product and the consumer. **British Food Journal**, Bradford, v. 100, n. 5, p. 236-243, 1998.

LEITE, M.O. **Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo Minas curado**. 1993. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MACHADO, E.C. et.al. Características Físico-Químicas e sensoriais do Queijo Minas Artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(4): 516-521. 2004.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2-3, p. 127-144, 2004.

MCSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. **Le Lait**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 293–324, 2000.

MEDEIROS, M.L. **Indicações geográficas, turismo e desenvolvimento territorial: uma análise sistêmica da indicação de procedência do queijo minas artesanal do Serro**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal e dá outras

providências. Belo Horizonte: **Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002.** Disponível em <http://www.almg.gov.br/>. Acessado em setembro de 2018.

MINAS GERAIS. **Instituto Mineiro de Agropecuária.** Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. Diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal.

NELSON, P.E. et al. **Fusarium species – an illustrated manual for identification.** EUA: Oxford, 193 p, 1983.

NERO, L. A. *et al.* Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 299–305, 2008.

OGIER, J.C.; SON, O.; GRUSS, A.; TAILLIEZ, P.; DELACROIX-BUCHET, A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. **Appl Environ Microbiol** 68:3691–3701. 2002.

ORDONÉZ J.A. e Colaboradores. Tecnologia de Alimentos vol 2: Alimentos de Origem Animal. **Editora Artmed.** Porto Alegre – RS, 2005. ISBN: 85-363-0431-6. 2005.

ORNELAS, E. A. **Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra.** 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ÖZGÖREN, E. Aflatoxin M1 contaminations in mouldy cheese. **Mljekarstvo.** 66 (2), 154-159. 2016.

PANGALLO, D. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. **International Journal of Food Microbiology.** 2014.

PERIN, L.M. et.al. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture dependant and -independent methods. **Food Microbiology.** 2017.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova.** 27, 293. 2004.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. 2 nd ed. London: **Blackie Academic and Professional**, 540 p. 1997.

POTTIER, I. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. **International Journal of Food Microbiology.** 126: 327–332. 2008.

SACRISTÁN, N. et. al. Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese. **Food Microbiology.** 2012.

SANSOM, A.; HOESKSTRA, E.S.; FRISVALD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-bourne fungi. 4th ed. Centraalbureau voor schimmel cultures. **Baarn and Delft.** 1995.

SANTOS, A.S. **Queijo minas artesanal da microrregião do Serro-MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação.** Diamantina: UFVJM, 2010. 67p.

SILVA, J. G. et al. Influência do fermento endógeno nas características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 34, n. 273, p. 7-13, mar./abr. 2013.

SOBRAL, D.; et.al. Major defects in artisanal Minas cheese: a review. **Rev. Inst. Laticínios**. v. 72, n. 2, p. 108-120, abr/jun, 2017.

TONIETTO, J. Afinal o que é terroir? **Bom vivant. Flores da Cunha**. v. 8, n. 98, p. 08, abr. 2007.

TORKAR, K.G.; TEGER S.G. The presence of some pathogen microorganisms, yeasts and moulds in cheese samples produced at small dairy-processing plants. **Acta Agric Slov** 88:37–51. 2006.

WOUTERS, J. T., AYAD, E. H., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, 12(2), 91-109. 2002.

ZEPEDA, A.E. et al. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. **Food Microbiology** 57. 116-127. 2016.

CAPÍTULO 2

Micobiota *terroir* em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro: segurança e qualidade

RESUMO

O Queijo Minas Artesanal oriundo da microrregião do Serro - MG é produzido de forma artesanal (sem condições controladas) a partir de leite de vaca cru e culturas de soro natural como iniciantes (microrganismos nativos) denominado “pingo”, gerando um produto de sabor único devido as particularidades de seu *terroir*. Como se sabe, os representantes de sua microbiota *terroir* estão associados à produção de certos compostos que impulsionam o processo de maturação, desenvolvendo as características organolépticas que irão determinar a tipicidade deste queijo. Tendo em vista, o deficiente conhecimento a respeito da biodiversidade encontrada nesses produtos. E ainda, a falta de compreensão sobre as mudanças que esses grupos microbianos sofrem ao longo do ano, em decorrência de variações sazonais, influenciando tanto em parâmetros físico-químicos quanto sensoriais. Esse trabalho teve por objetivo determinar a micobiota *terroir* (leveduras e fungos filamentosos) presentes no ambiente das câmaras de maturação e no QMA, produzido durante o período de inverno na microrregião do Serro-MG, bem como avaliar suas características físico-químicas. A quantificação da micobiota no QMA foi realizada pela técnica de diluição seriada, expresso em UFC/g, e pelo repique direto da superfície do queijo (Swab), e para a quantificação no ambiente das câmaras de maturação foi empregada a técnica de sedimentação, e os resultados expressos em UFC/cm²/semana. A micobiota foi identificada por caracterização fenotípica e MALDI-TOF MS. Determinou-se os parâmetros físico-químicos (umidade, pH, NaCl, acidez e gordura) do QMA em cada propriedade. Quanto à micobiota, constatou-se a predominância de fungos filamentosos no ar das câmaras de maturação, e de leveduras nas amostras de QMA em todas as propriedades. No ambiente de maturação identificou-se a levedura *Trichosporon japonicum*. Para os fungos filamentosos prevaleceram os gêneros *Penicillium*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium* e o *Complexo Cladosporium cladosporioides*. No QMA foi identificado apenas leveduras benéficas que contribuem para as características sensoriais do queijo, sendo elas: *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*. Já os gêneros de fungos filamentosos isolados foram: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Complexo Cladosporium cladosporioides*, *Scopulariopsis*, *Geotrichum* e *Alternaria*. Dentre as espécies isoladas, apenas *Geotrichum candidum* pode ser considerado benéfico, contribuindo com as características organolépticas do produto. O presente estudo possibilitou o conhecimento das principais espécies relacionadas com desenvolvimento das características sensoriais do produto e ainda, a detecção de espécies contaminantes e possivelmente toxigênicas, como *A. flavus*, *P. crustosum* e *P. commune*. Também se observou a presença de espécies capazes de deteriorar o produto como *A. japonicum*, *A. niger* (não produtor de Ocratoxina A), *Scopulariopsis*, *Penicillium glabrum* e *Complexo Cladosporium cladosporioides*. Nos parâmetros físico-químicos, os percentuais de umidade, cloreto de sódio, pH e gorduras não apresentaram diferença estatística entre as amostras. Já o percentual de ácido láctico (acidez), houve diferenças estatísticas significativas. A descrição da micobiota *terroir* mostrou-se importante para a avaliação da segurança e qualidade do QMA.

Palavras-chave: Queijo artesanal. Micobiota. Identificação. Preservação.

ABSTRACT

The Minas Gerais Craft Cheese from the Serro - MG microregion is produced artisanally (without controlled conditions) from raw cow's milk and natural whey cultures as beginners (native microorganisms) called "pingo", generating a product with a unique flavor due to the peculiarities of its *terroir*. As is known, the representatives of its *terroir* microbiota are associated with the production of certain compounds that boost the maturation process, developing the organoleptic characteristics that will determine the typicality of this cheese. In view of the poor knowledge about the biodiversity found in these products. Also, the lack of understanding about the changes that these microbial groups suffer during the year, due to seasonal variations, influencing both physicochemical and sensorial parameters. This work aimed to determine the mycobiota *terroir* (yeasts and filamentous fungi) present in the environment of the maturation chambers and in the QMA, produced during the winter period in the Serro-MG micro-region, as well as to evaluate its physicochemical characteristics. The quantification of mycobiota in the QMA was performed by the serial dilution technique, expressed in CFU / g, and by the direct peel of the cheese surface (Swab), and for the quantification in the environment of the maturation chambers the sedimentation technique was used, and the results expressed in CFU / cm² / week. Mycobiota was identified by phenotypic characterization and MALDI-TOF MS. The physical-chemical parameters (moisture, pH, NaCl, acidity and fat) of the QMA were determined in each property. As for the mycobiota, it was verified the predominance of filamentous fungi in the air of the maturation chambers, and of yeasts in the samples of QMA in all the properties. In the maturation environment the yeast *Trichosporon japonicum* was identified. The genus *Penicillium*, *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium* and the *Cladosporium cladosporioides* Complex prevailed. In the QMA, only beneficial yeasts that contribute to the sensory characteristics of the cheese were identified: *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* and *Yarrowia lipolytica*. The genus of isolated filament fungi were: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium cladosporioides* complex, *Scopulariopsis*, *Geotrichum* and *Alternaria*. Among the species isolated, only *Geotrichum candidum* can be considered beneficial, contributing with the organoleptic characteristics of the product. The present study made possible the knowledge of the main species related to the development of sensorial characteristics of the product and also the detection of contaminating and possibly toxigenic species such as *A. flavus*, *P. crustosum* and *P. commune*. The presence of species capable of deteriorating the product as *A. japonicum*, *A. niger* (non-producer of Ochratoxin A), *Scopulariopsis*, *Penicillium glabrum* and Complex *Cladosporium cladosporioides* were also observed. In the physical-chemical parameters, the percentages of humidity, sodium chloride, pH and fats did not present statistical difference among the samples. As for the percentage of lactic acid (acidity), there were significant statistical differences. The description of the mycobiota *terroir* was important for the evaluation of the safety and quality of the QMA.

Keywords: Artisanal cheese. Mycobiota. Identification. Preservation.

1. INTRODUÇÃO

Os queijos artesanais são os principais produtos lácteos produzidos em diferentes países da Europa e América, e são reconhecidos por sua importância econômica, social e cultural. No Brasil, Minas Gerais, é considerado o maior estado produtor de queijos do país (GOMES, et al. 2011), e inclui algumas microrregiões produtoras dos conhecidos Queijos Minas Artesanais (QMA). Os QMAs, como os produzidos na microrregião do Serro, são fabricados a partir de leite de vaca cru e culturas de soro natural como iniciantes. Este inóculo endógeno, rico em microrganismos nativos, denominado “pingo”, consiste no soro coletado após a prensagem do queijo do dia anterior. O sabor do QMA é único, devido as particularidades de seu *terroir* como: o clima, pastagem nativas, altitude, temperatura, tipo de solo, umidade relativa do ar e pela ação da microbiota, sendo assim é considerado patrimônio imaterial do Estado de Minas Gerais (BEMFEITO, 2016; EMATER, 2019; SILVA, 2013; BORELLI, 2006; HARBUTT, 2010; MACHADO 2004; SANTOS 2010; INPI, 2011).

Na fabricação de queijos fermentados, a maturação é a etapa final e crucial para o estabelecimento das características sensoriais típicas e de segurança do produto. Nesse processo, a presença e ação dos microrganismos envolvem transformações bioquímicas, estabelecida por proteólise, glicólise e lipólise que agem modificando as propriedades físico-químicas do queijo, e formando compostos que influenciarão diretamente nas características organolépticas determinando assim seu sabor, aroma e textura (FOX, 1998). Estas alterações podem ainda criar um ambiente inóspito para o crescimento de patógenos (BONY, 2015; DINIZ, 2013). Entretanto, pelo fato do QMA ser produzido e maturado de forma artesanal, sem condições controladas, é possível a veiculação de microrganismos patogênicos e com capacidade de produzir toxinas. Por isso, vê-se a importância da adequação às normas de fabricação higiênicas e sanitárias previstas pela legislação vigente (SANTOS, 2010).

Com essa preocupação, foi definido pela Portaria nº 1736, de 27 de abril de 2017, diretrizes para a produção do QMA, e o IMA definiu para a microrregião do Serro um período mínimo de 17 dias de maturação em temperatura ambiente (IMA, 2019).

Um dos grandes desafios atuais é obter uma visão clara do perfil microbiológico presente durante a produção e maturação do QMA, e sua influência nas características físico-químicas e sensoriais destes queijos. E ainda compreender a relação das mudanças que esses grupos microbianos sofrem ao longo do ano, em decorrência de variações sazonais, e consequentemente alteração na composição do QMA (BONY, 2015; FIGUEIREDO, 2014; SOBRAL, 2017). A falta de conhecimento e estudos principalmente a respeito dos fungos filamentosos encontrados na superfície destes queijos maturados (QMA “mofados”), tem

gerado receio. Uma vez que, no processo de maturação podem se desenvolver fungos filamentosos micotoxigênicos, prejudiciais à saúde (SOBRAL, 2017).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi determinar a microbiota *terroir* (leveduras e fungos filamentosos) presentes no ambiente das câmaras de maturação e no QMA, produzido durante o período de inverno na microrregião do Serro-MG, bem como avaliar suas características físico-químicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas em queijarias cadastradas pelo IMA, localizadas no município do Serro, região da Serra do Espinhaço, no estado de Minas Gerais, Brasil.

2.1 Amostragem

Foram coletadas duas amostras de queijos do mesmo lote (Figura 5) em 3 propriedades produtoras conforme representado na Tabela 1, com período de maturação em uma faixa de 30 a 45 dias, no período de inverno seco e frio (Setembro) no ano de 2017 (Figura 5).

As amostras foram embaladas nas câmaras de maturação (Figura 6), armazenadas em sacos estéreis e transportadas em caixas térmica para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas, do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizadas as análises.

Figura 5 - Amostras de QMA da propriedade 1 da microrregião do Serro-MG.



Fonte: Do autor (2019).

Tabela 1 - Coordenadas geográficas de três propriedades de QMA da microrregião do Serro-MG, onde foram feitas as coletas.

Propriedades	Coordenadas Geográficas		
	Latitude	Longitude	Altitude
1	18°34"15' S	43°19"40' W	701 m
2	18°33"03' S	43°19"19' W	782 m
3	18°29"43' S	43°22"03' W	858 m

Fonte: Do autor (2019).

Figura 6 - Câmara de maturação de QMA da propriedade 2 da microrregião do Serro-MG.



Fonte: Do autor (2019).

2.2 Quantificação da microbiota do ar das câmaras de maturação da microrregião do Serro-MG

Na análise do ar das câmaras de maturação dos QMA das três propriedades, foi empregada a técnica de sedimentação, que consiste na exposição de placas de Petri contendo o meio Ágar Dichloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (10,0g/L de Glicose; 5,0/L de Peptona Bacteriológica; 1,0g/L de KH₂PO₄; 0,5g/L de MgSO₄.7H₂O; 0,5mL de solução 5% de Rosa de Bengala; 1,0mL de Dicloran; 15,0g/L de Ágar; 1mg/L de cloranfenicol) (ANDRADE, 2008). As placas foram distribuídas pelas câmaras de maturação, e expostas ao contato direto com o ar por cerca de 15 minutos sendo, posteriormente, embaladas e transportadas ao Laboratório de Micologia e Micotoxinas para análise.

As placas foram incubadas em BOD à 25°C por 7 dias para posterior contagem determinada pela fórmula a seguir, conforme descrito por Andrade (2008):

$$\text{Partículas viáveis por cm}^2/\text{Semana} = \frac{\text{UFC} \cdot 10080^*}{(\pi \cdot r^2) \cdot t}$$

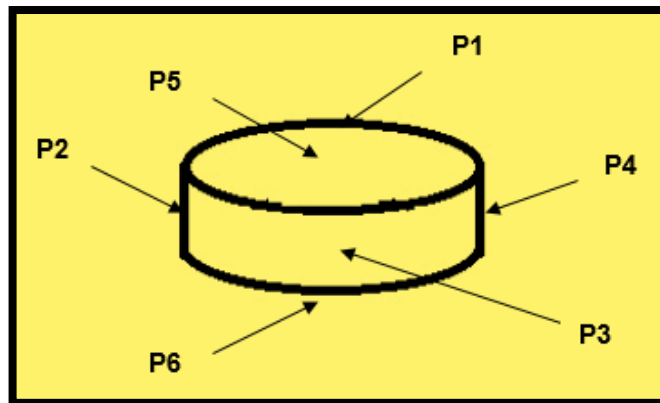
Onde: UFC= número de colônias em placa de Petri; * = minutos por uma semana; r= raio da placa; t= tempo de exposição da placa de Petri.

2.3 Quantificação da microbiota do QMA da microrregião do Serro-MG

O isolamento de fungos filamentosos e de leveduras a partir das amostras de QMA foi realizado por meio de dois métodos, em meios de cultura padronizados para o isolamento de cada microrganismo.

O primeiro consiste no repique direto da casca do queijo, com auxílio de Swab (ANDRADE, 2008), para o meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MA). O segundo método foi empregando a técnica de diluição seriada. Foram utilizados 25 g de casca de queijo triturada grosseiramente, previamente coletadas de 4 pontos equidistantes da lateral (P1, P2, P3 e P4), 1 ponto central da base e outro da superfície (P5 e P6) (Figura 7), adicionados em 225mL de água peptonada 0,1%.

Figura 7- Modelo esquemático de preparo da amostra para técnica de diluição seriada.



Fonte: Adaptado de Aragão (2018).

A solução foi agitada em Stomacker, onde foi submetida à 490 golpes/2 minutos. Em seguida procedeu-se com diluições sucessivas em água peptonada 0,1%. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram transferidas e espalhadas para os seguintes meios de cultura: Ágar Dichloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC); Dichloran Glicerol Medium Base (DG18) (1,0mL de Dicloran; 5,0g/L de Peptona Bacteriológica; 1,0g/L de KH₂PO₄; 0,5g/L de MgSO₄.7H₂O; 220g/L de Glicerol; 15,0g/L de Ágar; 1mg/L de cloranfenicol); e Yeast Extract Peptone Glucose Ágar (YEPG) pH 3,5.

Após um período de incubação por 7 dias em BOD à 25°C, foi realizada a contagem em unidades formadoras de colônias (UFC/g).

2.4 Purificação e Identificação dos isolados

Após a contagem dos microrganismos presentes na câmara de ar e no queijo, foi realizada a caracterização morfológica (cor da colônia, cor do micélio, cor do reverso, presença

de estrias no reverso, forma, tamanho, superfície, bordas e perfil) das colônias crescidas nos meios de cultivo de modo a se obter a diferenciação dos morfotipos presentes. Prosseguiu-se com o isolamento dos fungos filamentosos no meio Ágar Extrato de Malte (MA) e as leveduras no meio YEPG pH 3,5. Foi empregada a técnica de raiz quadrada para determinar o total de fungos filamentosos e leveduras que seriam isolados. Após a obtenção das colônias puras pela repicagem sucessiva, os isolados foram preservados à -80°C e iniciou-se o processo de identificação. Os isolados de fungos filamentosos foram preservados em duplicata por dois métodos distintos. Por meio de coleta dos esporos com auxílio de papel filtro em tubos tipo eppendorf, preservados a uma temperatura de -18°C, e como método principal de preservação, a técnica de Criopreservação a -80°C em glicerina 15% como crioprotetor. Os isolados de leveduras foram armazenados em duplicata em tubos de eppendorf, preservados pela técnica de Criopreservação a -80°C.

Para a identificação dos fungos filamentosos, estes foram crescidos em meios específicos dependendo do gênero encontrado. Os isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram inoculados em meios de cultura Ágar Czapek Levedura (CYA) [K₂HPO₄: 1,0 g; concentrado czapek: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g, ágar: 15,0 g, água destilada: 1 L; (concentrado czapek: NaNO₃: 30,0 g, KCl: 5,0 g, MgSO₄.7H₂O: 5,0 g, FeSO₄.7H₂O: 0,1 g, ZnSO₄.7H₂O: 0,1 g, CuSO₄.5H₂O: 0,05 g, água destilada: 100 mL)] com incubação em BOD à 25°C e 37°C por 7 dias, e Ágar Extrato de Malte e Levedura (MEA) (extrato de malte: 20,0 g, peptona bacteriológica: 1,0 g, glicose: 30,0 g, ágar: 20,0 g, água destilada: 1L) incubado em BOD à 25°C por um período de 7 dias. Para os demais gêneros utilizou-se o meio de cultura MEA com incubação em BOD à 25°C por 7 dias para a caracterização morfológica e identificação. Foram retiradas as características macroscópicas e microscópicas das colônias dos fungos filamentosos e comparados com manuais de identificação. Para as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, o Manual de Klich (2002), para o gênero *Penicillium*, o Manual de Pitt (2000), *Fusarium* o Manual de Leslie (2006), e para os demais gêneros isolados, o Manual de Samson, Hoekstra, Frisvad e Filtenborg (1995).

2.4.1 Identificação por MALDI-TOF MS

Todos os isolados de leveduras e fungos filamentosos após purificação e avaliação da morfologia foram submetidos a análises do seu perfil de proteínas ribossomais a fim de realizar um agrupamento e possível identificação das espécies utilizando MALDI- TOF MS. As colônias foram crescidas em placas de Petri contendo meio Ágar Extrato de Malte (MA) para os fungos filamentosos, incubados em BOD à 25 °C por 3 dias, e meio Yeast Extract Peptone

Glucose Ágar (YEPG) para leveduras, incubadas em BOD à 28 °C por 18 horas. Após o crescimento para análise das leveduras foram transferidas aproximadamente 3×10^7 células de cada isolado para microtubos estéreis. Posteriormente foram adicionados 6µL de solução de ácido fórmico 25% em cada microtubo e então homogeneizado em vórtex por 1min. Em seguida, 1µl desta suspensão foi transferida para a placa MALDI flex target (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Após evaporação quase completa do líquido na placa, 1 µL de solução matriz foi adicionado e homogeneizado [solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) em acetonitrila a 50%; ácido trifluoroacético a 2,5%] (OLIVEIRA et al. 2015). Para os fungos filamentosos, uma pequena amostra de cada colônia fresca, aproximadamente 1 µg, foi transferida diretamente para a placa MALDI flex target e adicionou-se duas soluções matrizes, afim de obter melhores espectros. Foi adicionado 1 µL de solução matriz 1 [solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) em acetonitrila a 50%; ácido trifluoroacético a 2,5%] (OLIVEIRA et al. 2015), e em seguida adicionando 1 µL de solução matriz 2 [solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) em acetonitrila a 50%; ácido trifluoroacético a 1,5%] (LIMA, 2017). Para ambos microrganismos o mix da amostra com a matriz foi seco à temperatura ambiente e a análise realizada em um sistema do MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), em triplicata para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros.

Para a calibração do equipamento foi empregado a cepa *Escherichia coli* K12, cultivada em meio Ágar Luria-Bertani (LB) (bactotripton, 1,0 g; extrato de bactoheyeast, 0,5 g; NaCl, 1,0 g; ágar, 15,0 g; água destilada, 1 L) incubada em BOD à 37 °C por 18 horas. Após incubação, aproximadamente 1 µg de material celular de uma única colônia de *E. coli* K12 foi transferido, em triplicata, diretamente para a placa MALDI flex target e adicionou-se a solução matriz para a análise (LIMA, 2017).

Por fim, os espectros de massa foram processados com o pacote de software 3.0 do MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para a identificação microbiana. Para a avaliação dos resultados gerados pelo MALDI-TOF MS são considerados os valores de score exibidos na Tabela 2.

Tabela 2- Legenda para os valores de score gerados pelo MALDI-TOF MS.

Faixa	Descrição
< 2,000	Probabilidade alta de identificação da espécie
1,700 - 1,999	Provável identificação da espécie
> 1,700	Identificação não confiável

Fonte: Do autor (2019).

2.5 Avaliação do potencial toxigênico de fungos filamentosos

Os isolados potencialmente produtores de Ocratoxina A (OTA) e Aflatoxinas B1 e B2 (AFB1 e AFB2), como as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* das Seções *Nigri* e *Flavi*, foram avaliados pelo método de Cromatografia de Camada Delgada para confirmação da produção e identificação da micotoxina (Plug Agar).

Para esta análise as espécies micotoxigênicas do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri* foram inoculadas em meio Ágar Czapek Levedura (CYA) [K₂HPO₄: 1,0 g; concentrado czapec: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g, ágar: 15,0 g, água destilada: 1 L; (concentrado czapec: NaNO₃: 30,0 g, KCl: 5,0 g, MgSO₄.7H₂O: 5,0 g, FeSO₄.7H₂O: 0,1 g, ZnSO₄.7H₂O: 0,1 g, CuSO₄.5H₂O: 0,05 g, água destilada: 100 mL)] por 10 dias a 25 °C. Já as espécies pertencentes à Seção *Flavi* foram inoculadas em meio Ágar Extrato de Levedura Sacarose (YES) (extrato de levedura: 20,0 g; sacarose: 150 g; ágar: 20,0 g; ZnSO₄.7H₂O: 0,1 g; CuSO₄.5H₂O: 0,05 g; água destilada: 1 L), também por 10 dias a 25 °C conforme Filtenborg (1980). Após a incubação, um disco da colônia pura de cada isolado foi colocado em pontos equidistantes na placa de cromatografia em camada delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20 x 20). Subsequentemente, 10 µl das soluções padrão de OTA, Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 (SIGMA-ALDRICH) foram adicionados em um ponto predeterminado na placa de cromatografia. A fase móvel foi composta por tolueno, acetato de etilo e ácido fórmico a 90% (60:30:10).

Após a eluição e secagem das placas em capela de fluxo laminar, foi feita a verificação quanto à produção de micotoxinas em luz ultravioleta com λ 366 nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de OTA, AFB1 e AFB2 apresentaram um fator de retenção e um *spot* de fluorescência semelhante ao dos padrões utilizados.

2.6 Análises físico-químicas

As amostras de QMA foram fracionadas para obter uma porção de casca e outra de massa do queijo. Foi inicialmente mensurado em milímetros a espessura da casca de cada amostra de QMA com paquímetro, sendo considerado uma faixa entre 66 à 74mm de casca. Foram submetidas às análises físico-química em três repetições para determinação dos teores de umidade, gorduras e cloreto de sódio, acidez e pH.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Leite e Produtos Lácteos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras de acordo com os procedimentos da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006) e da Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006, que define os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos (BRASIL, 2006).

2.6.1 Acidez

A determinação da acidez foi realizada através da análise de acidez titulável, que consiste na titulação da amostra de queijo com solução alcalina de hidróxido de sódio (0,1 mol/L), em presença do indicador fenolftaleína. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido láctico em triplicata, utilizando 5g da amostra homogeneizada com 50 mL de água destilada (AOAC, 2006).

2.6.2 Cloreto de Sódio

A quantificação dos cloretos foi realizada através da análise de teor de NaCl. Para isso foi empregado 5g da amostra diluída em 20mL de água destilada, titulada com solução 0,1M de nitrato de prata (AgNO₃) em presença do indicador cromato de potássio, método de Mohr (AOAC, 2006).

2.6.3 pH

O pH da amostra foi determinado utilizando-se pHmetro previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente em 5g da amostra homogênea com 50mL de água destilada, em triplicata (AOAC, 2006).

2.6.4 Umidade

A umidade foi determinada utilizando o analisador de umidade (OHAUS-MB23) empregando 3g de amostra.

2.6.5 Gorduras

O percentual de lipídeos foi obtido pelo método butirométrico, utilizando-se butirômetro especial para queijo (método de Van Gulik), baseado na digestão da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico. Após a separação da gordura por ação do álcool isoamílico e centrifugação, realizou-se a leitura em escala própria (AOAC, 2006).

2.7 Análise estatística

Para melhor interpretação do conjunto de dados foi realizada a análise dos componentes principais (PCA, Principal Component Analysis), utilizando o *software* SensoMaker (PINHEIRO, 2013). As diferenças estatísticas entre a avaliação físico-químicas das amostras foram avaliadas empregando-se a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o *software* Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação da microbiota *terroir* presente no ar das câmaras de maturação do Queijo Minas Artesanal e na superfície do queijo (Swab)

Foi avaliado a microbiota (fungos filamentosos e leveduras) presente no ar em câmaras de maturação das 3 propriedades produtoras de Queijo Minas Artesanal e o resultado da quantificação está apresentado na Tabela 3. Verificou-se que apenas a propriedade 3 se diferenciou estatisticamente ($p < 0,05$) das demais propriedades (1 e 2). Foi observada maior carga microbiana no ar das câmaras de maturação das propriedades 1 e 2 respectivamente: $5,92 \times 10^2$ e $4,80 \times 10^2$ UFC.cm⁻².semana⁻¹.

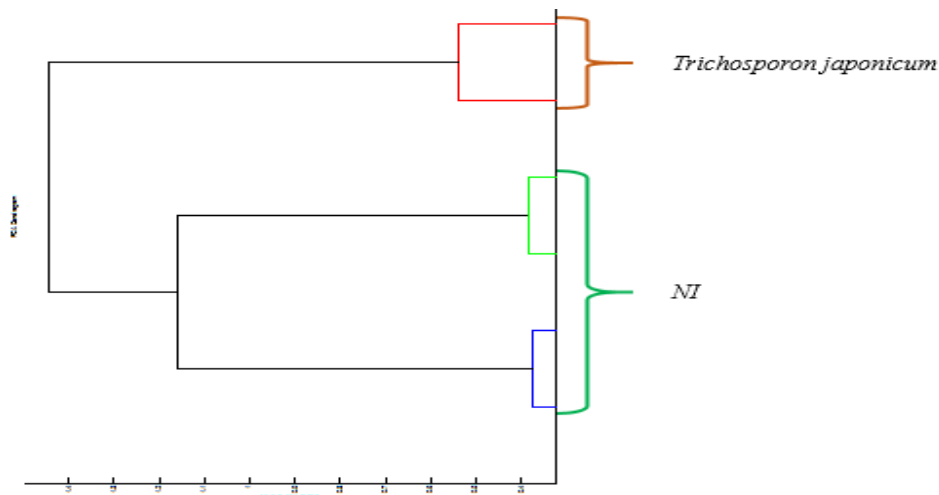
Tabela 3 - Contagem da população total (fungos filamentosos e leveduras) presente no ar das câmaras de maturação de 3 propriedades produtoras de QMA do Serro-MG.

Propriedade	Faixa de contagem UFC.cm ⁻² .semana ⁻¹	Média
1	$5,06 \times 10^2 - 6,78 \times 10^2$	$5,92 \times 10^2$ ^a
2	$4,15 \times 10^2 - 5,46 \times 10^2$	$4,80 \times 10^2$ ^a
3	$6,1 \times 10 - 1,21 \times 10^2$	$9,1 \times 10$ ^b

Legenda: Faixa de contagem = diferença entre a placa de menor contagem e a placa de maior contagem. *Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença estatística significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Fonte: Do autor (2019).

Foram isoladas 4 e 2 leveduras do ar das câmaras de maturação de QMA do Serro das propriedades 1 e 3 respectivamente. Ao analisar o perfil proteico por MALDI-TOF, apenas dois isolados presentes em ambas as propriedades (1 e 3) apresentaram identificação confiável, os demais não apresentaram resultados satisfatórios (Figura 8). Estes foram identificados como *Trichosporon japonicum*, com o score maior que 2.

Figura 8 - Dendograma dos isolados de levedura presentes no ar das câmaras de maturação das propriedades 1 e 3 do Serro.

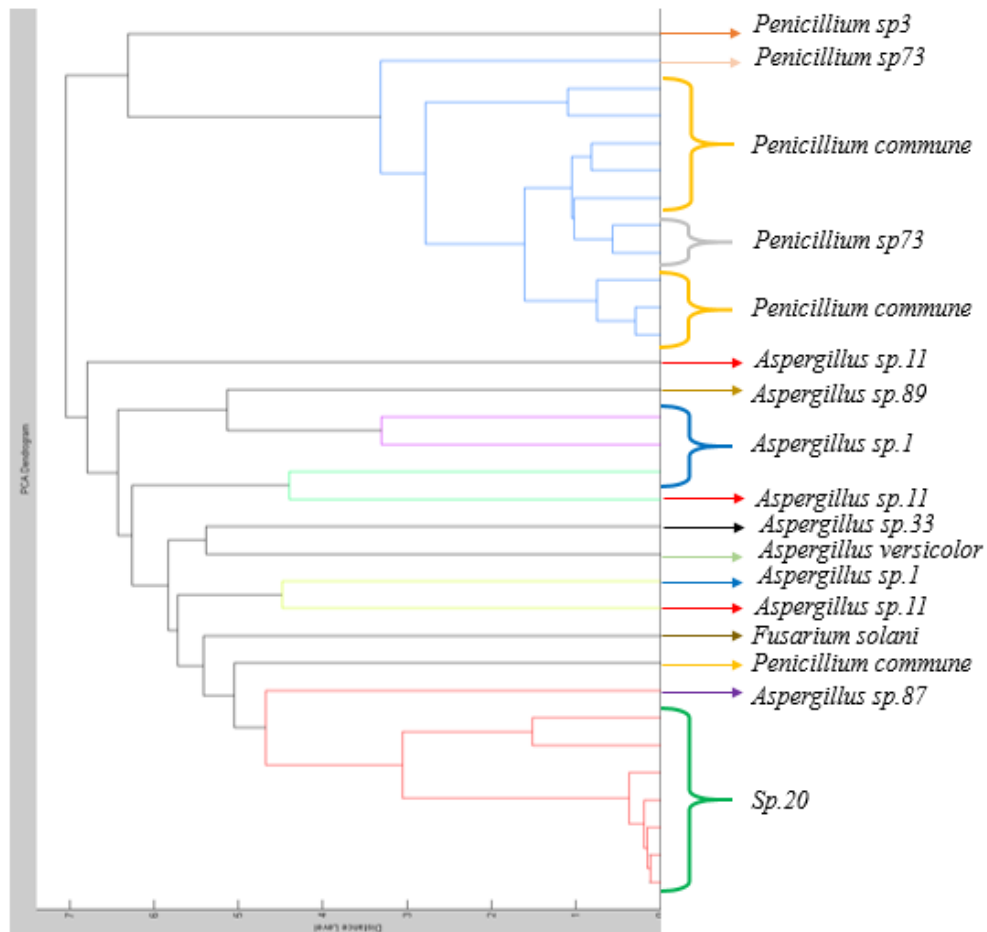


Legenda: NI: Levedura sem identificação. Fonte: Do autor (2019).

Foi obtido um total de 77 isolados de fungos filamentosos do ar das câmaras de maturação. Esses isolados foram identificados morfológicamente de acordo com os manuais de identificação e realizada a análise do perfil proteico por MALDI-TOF, dos mesmos.

Foram isolados 31 fungos filamentosos do ar da câmara de maturação da propriedade 1. Ao analisar o perfil proteico por MALDI-TOF, os isolados não apresentaram identificação confiável (Figura 9). No entanto, a fim de facilitar a observação dos isolados para melhor agrupa-los, cada isolado no dendograma recebeu sua denominação de acordo com a identificação morfológica.

Figura 9 - Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes no ar da câmara de maturação da propriedade 1 do Serro.

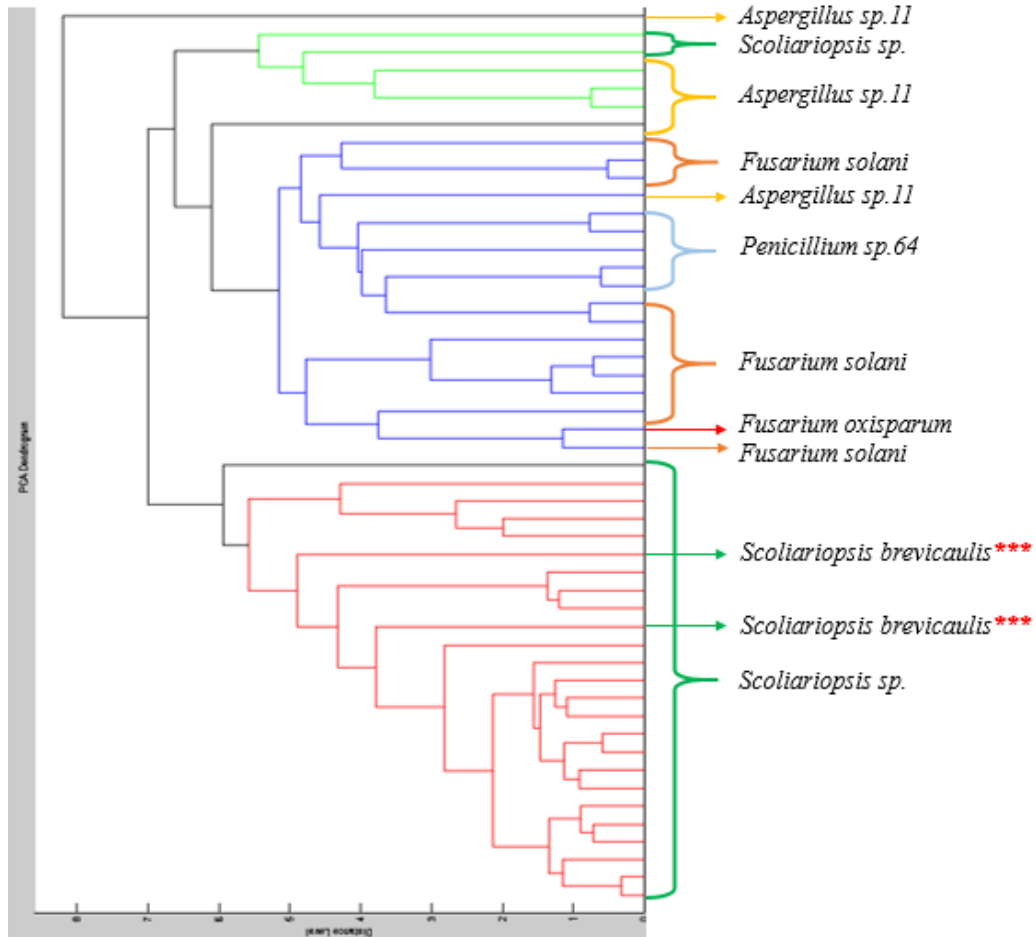


Legenda: Sp.20: Espécie de fungo filamentoso não identificada. Fonte: Do autor (2019).

Foram isolados 42 fungos filamentosos do ar da câmara de maturação da propriedade 2. Ao analisar o perfil proteico por MALDI-TOF, apenas dois isolados apresentaram identificação confiável, score > 2 (Figura 10). Os isolados foram identificados à nível de espécie como *Scopulariopsis brevicaulis*. Entretanto, a fim de facilitar a observação dos isolados para melhor

agrupa-los, cada isolado no dendograma recebeu sua denominação de acordo com a identificação morfológica.

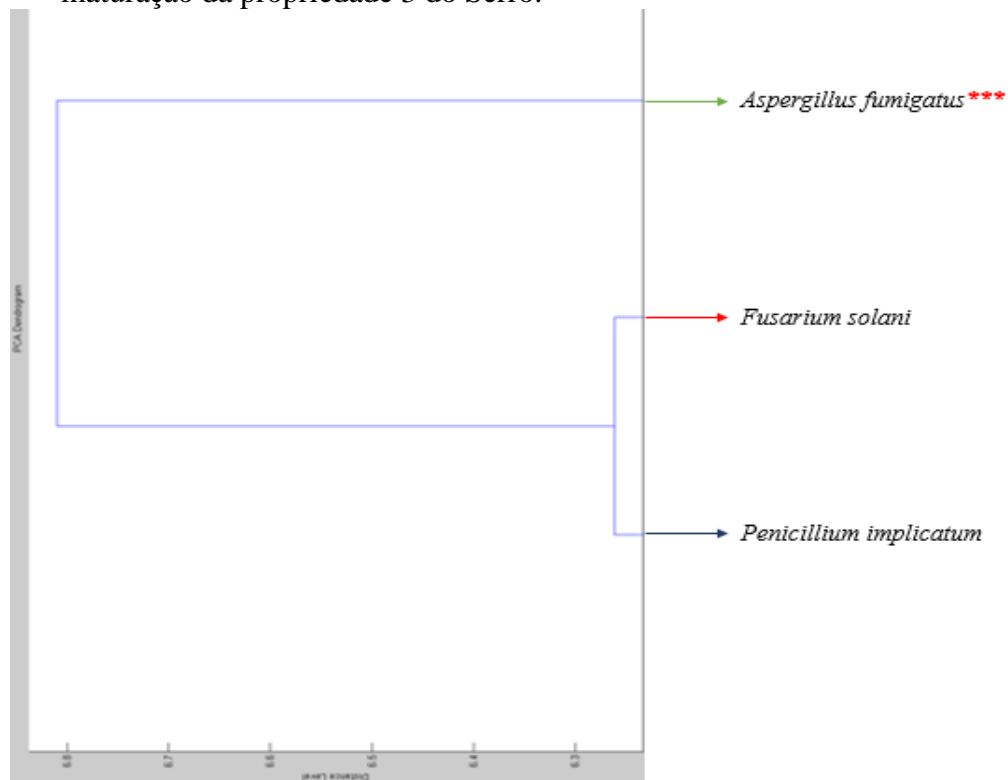
Figura 10 - Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes no ar da câmara de maturação da propriedade 2 do Serro.



Legenda: *** Identificação pelo MALDI TOF e por morfologia. Fonte: Do autor (2019).

Foram isolados 4 fungos filamentosos do ar da câmara de maturação da propriedade 3. Ao analisar o perfil proteico por MALDI-TOF, apenas um isolado apresentou identificação confiável, score > 2 (Figura 11) à nível de espécie como *Aspergillus fumigatus*. Entretanto, a fim de facilitar a observação dos isolados para melhor agrupá-los, cada isolado no dendograma recebeu sua denominação de acordo com a identificação morfológica.

Figura 11- Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes no ar da câmara de maturação da propriedade 3 do Serro.



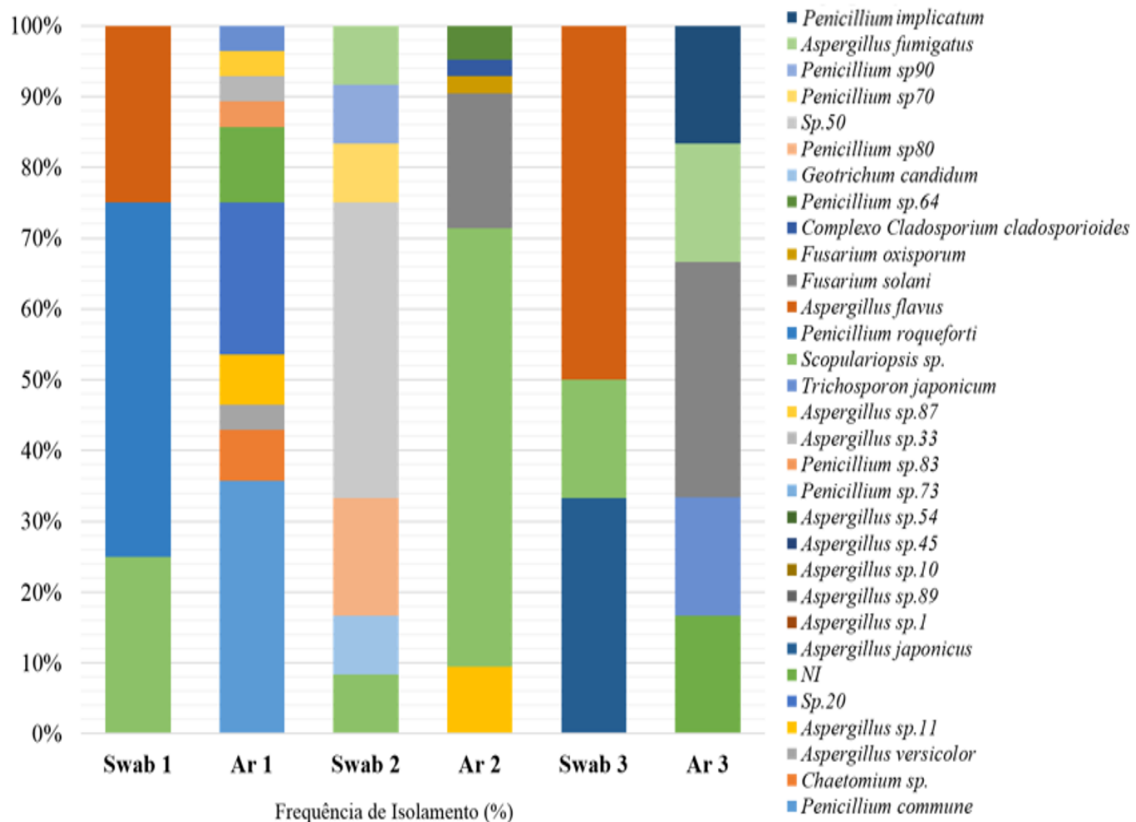
Legenda: *** Identificação pelo MALDI TOF e por morfologia. Fonte: Do autor (2019).

Através da análise do Swab, foram isolados 8, 12 e 6 fungos filamentosos da superfície do QMA da propriedade 1, 2 e 3 respectivamente. Esses isolados foram identificados morfologicamente de acordo com os manuais de identificação. As espécies identificadas em cada propriedade no ar da câmara de maturação e na superfície do queijo (Swab) estão dispostas na Figura 12.

Em relação às espécies identificadas no Swab. A propriedade 2 foi a que apresentou a maior diversidade de espécies sendo a predominante *Penicillium* sp.80 (16,66%), na propriedade 1 a predominante foi *Penicillium roqueforti* (50%), e na propriedade 3 foi *Aspergillus flavus* (50%). Todas as espécies de *Aspergillus flavus*, presentes nas propriedades 2 e 3, potencialmente toxigênicas de Aflatoxinas (B1 e B2).

Em relação às câmaras de maturação, a propriedade que apresentou maior diversidade de espécies identificadas foi a propriedade 1, sendo *Penicillium commune* (25,64%) a principal espécie encontrada, na propriedade 2 foi *Scopulariopsis* sp. (61,9%), e na propriedade *Fusarium solani* (33,3%).

Figura 12 - Frequência de fungos filamentosos e leveduras presentes na superfície dos queijos (Swab) e nas câmaras de maturação da propriedade 1 (Ar1), propriedade 2 (Ar2) e propriedade 3 (Ar3) produtoras de QMA do Serro.



Legenda: *NI*: Levedura sem identificação. *Sp.50* e *Sp.20*: Espécie de fungo filamentoso não identificada. Fonte: Do autor (2019).

3.2 Avaliação da microbiota *terroir* presente no Queijo Minas Artesanal do Serro através de diluição seriada

Determinou-se a população de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de 3 propriedades (A1, A2 e A3) produtoras de QMAs no Serro - MG pela técnica de diluição seriada. Foram avaliados nos meios DG18, YEPG e DRBC conforme descrito na Tabela 4.

A população média de leveduras das propriedades 2 e 3 apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Em relação aos fungos filamentosos, todas as 3 propriedades não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

A propriedade 2 apresentou a maior população média para as leveduras ($1,93 \times 10^8$ UFC/g) e fungos filamentosos ($3,2 \times 10^7$ UFC/g) presentes no queijo, comparado as outras propriedades. Em relação aos meios de cultura, para contagem de leveduras não houve diferença entre eles, porém para fungo filamentosos nas propriedades 2 e 3, cada meio apresentou contagem diferente.

Tabela 4- População da microbiota total e média (UFC/g) nos meios DG18, YEPG e DRBC, presente nas amostras compostas de QMA nas 3 propriedades avaliadas.

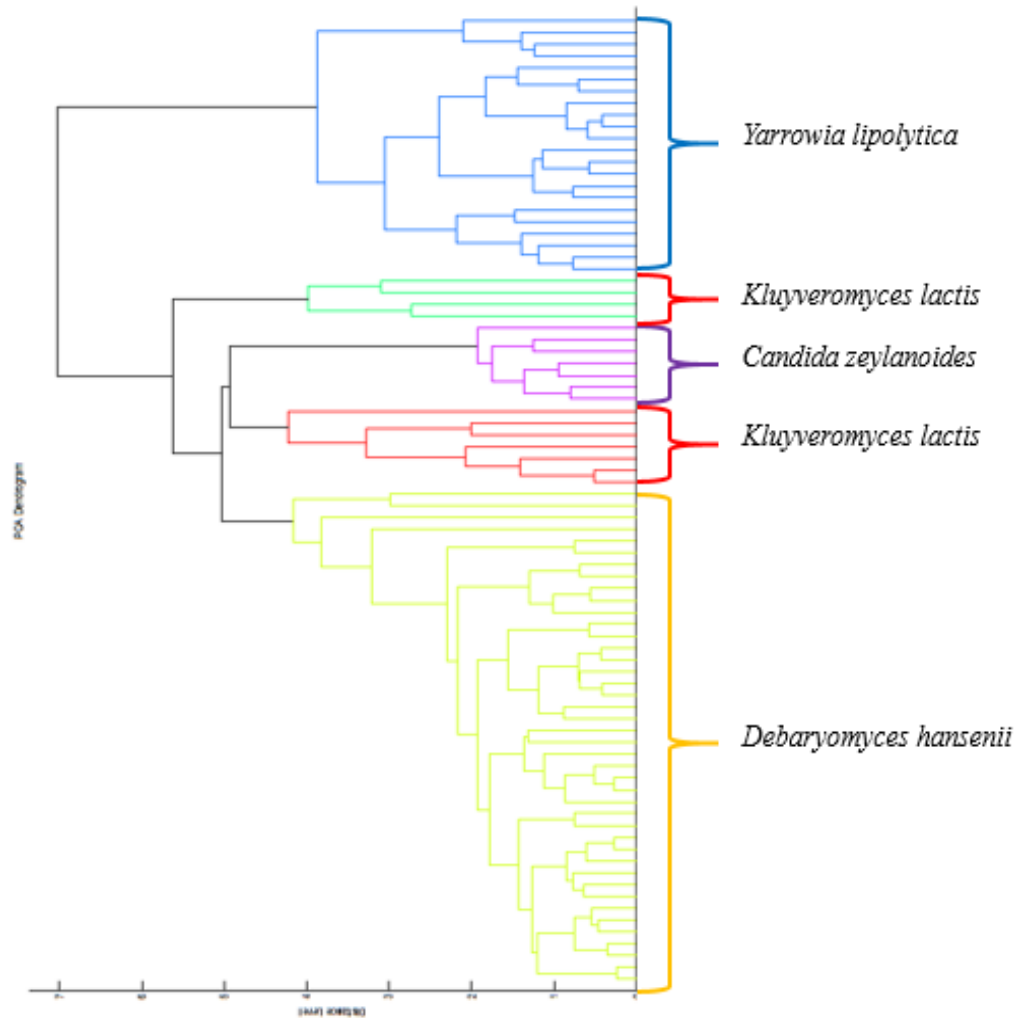
Amostras	Microrganismos	Meios de Cultura	População Total por Meio (UFC/g)	Média Total (UFC/g)
Propriedade 1	Fungo filamentoso	DG18	2,9 x10 ⁶	2,62 x 10 ^{6 a}
		YEPG	2,35 x10 ⁶	
		DRBC	2,63 x10 ⁶	
	Levedura	DG18	4,44 x10 ⁶	4,07 x10 ^{6 a}
		YEPG	3,47 x10 ⁶	
		DRBC	4,3 x10 ⁶	
Propriedade 2	Fungo filamentoso	DG18	1 x10 ⁶	3,2 x10 ^{7 a}
		YEPG	***	
		DRBC	1,6 x10 ⁷	
	Levedura	DG18	2,13 x10 ⁸	1,93 x10 ^{8 b}
		YEPG	1,59 x10 ⁸	
		DRBC	2,06 x10 ⁸	
Propriedade 3	Fungo filamentoso	DG18	***	1 x10 ^{6 a}
		YEPG	1 x10 ⁶	
		DRBC	***	
	Levedura	DG18	3,14 x10 ⁷	2,95 x10 ^{7 c}
		YEPG	3,16 x10 ⁷	
		DRBC	2,56 x10 ⁷	

Legenda: *Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença estatística significativa ao nível de 5% de significância (p<0,05) pelo teste de Tukey. *** Não existe contagem. Fonte: Do autor (2019).

Após a contagem da população, as leveduras e os fungos filamentosos foram isolados para posterior identificação, através da morfologia e análise em MALDI-TOF.

Em relação às leveduras, os resultados da identificação através do MALDI-TOF dos isolados da propriedade 1 (A1) são apresentados na Figura 13. Verificou-se que todos os isolados presentes apresentaram identificação confiável (score > 2). Os isolados foram identificados à nível de espécie como *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*.

Figura 13 - Dendograma dos isolados de levedura presentes na propriedade (A1) de QMA do Serro.



Fonte: Do autor (2019).

As espécies identificadas estão dispostas na Tabela 5 de acordo com a população (UFC/g). Na propriedade 1 (A1), a espécie de levedura com maior população foi *Kluyveromyces lactis* ($1,43 \times 10^6$ UFC/g).

Tabela 5 - População da microbiota presente nas amostras das 3 propriedades produtoras de QMA.

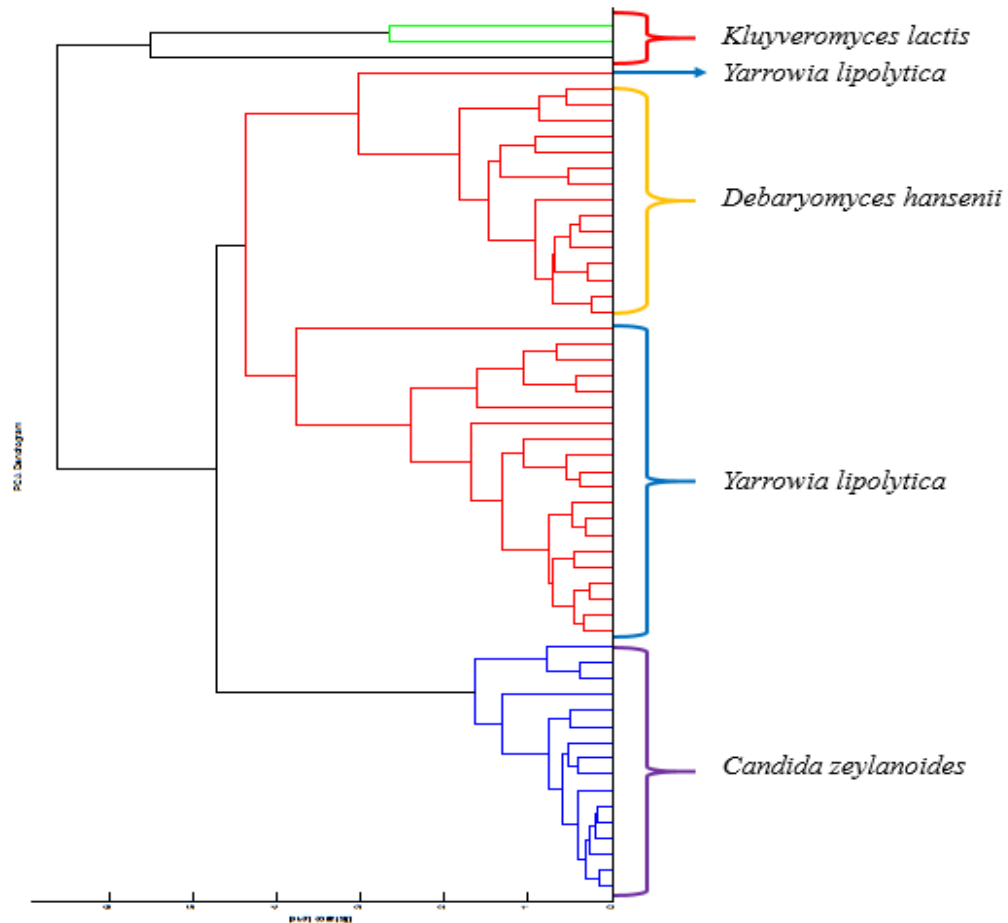
Fungos filamentosos/ Leveduras	População UFC/g		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
<i>Penicillium roqueforti</i>	1,52x10 ⁶	***	***
<i>Penicillium commune</i>	2x10 ⁵	***	***
<i>Penicillium crustosum</i>	1x10 ⁵	***	***
<i>Penicillium glabrum</i>	1x10 ⁵	***	***
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,23x10 ⁵	***	***
<i>Aspergillus niger</i>	7x10 ⁵	***	***
<i>Aspergillus sp.40</i>	1x10 ⁵	***	***
<i>Complexo Cladosporium cladosporioides</i>	5,6x10 ⁵	3,1x10 ⁷	***
<i>Alternaria sp.</i>	***	1x10 ⁶	1x10 ⁶
<i>Scolariopsis sp.</i>	***	1x10 ⁶	***
<i>Sp.30</i>	1x10 ⁵	***	***
<i>Candida zeylanoides</i>	1,5x10 ⁵	1,30x10 ⁸	1,31x10 ⁷
<i>Debaryomyces hansenii</i>	6,32x10 ⁵	5,04x10 ⁷	3,10x10 ⁶
<i>Yarrowia lipolytica</i>	4,25x10 ⁵	1,01x10 ⁷	***
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1,43x10 ⁶	3x10 ⁶	2x10 ⁶
<i>NI</i>	***	***	7x10 ⁶

Legenda: *NI*: Levedura sem identificação. *Sp.30*: Espécie de fungo filamentoso não identificada.

*** Não existe contagem. Fonte: Do autor (2019).

O resultado da análise do MALDI-TOF dos isolados de levedura da propriedade 2 (A2), são apresentados na Figura 14. Os isolados identificados à nível de espécie foram *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, sendo a espécie com maior população média *Candida zeylanoides* (1,30. 10⁸ UFC/g) (Tabela 5).

Figura 14 - Dendograma dos isolados de levedura presentes na amostra 2 de QMA do Serro.

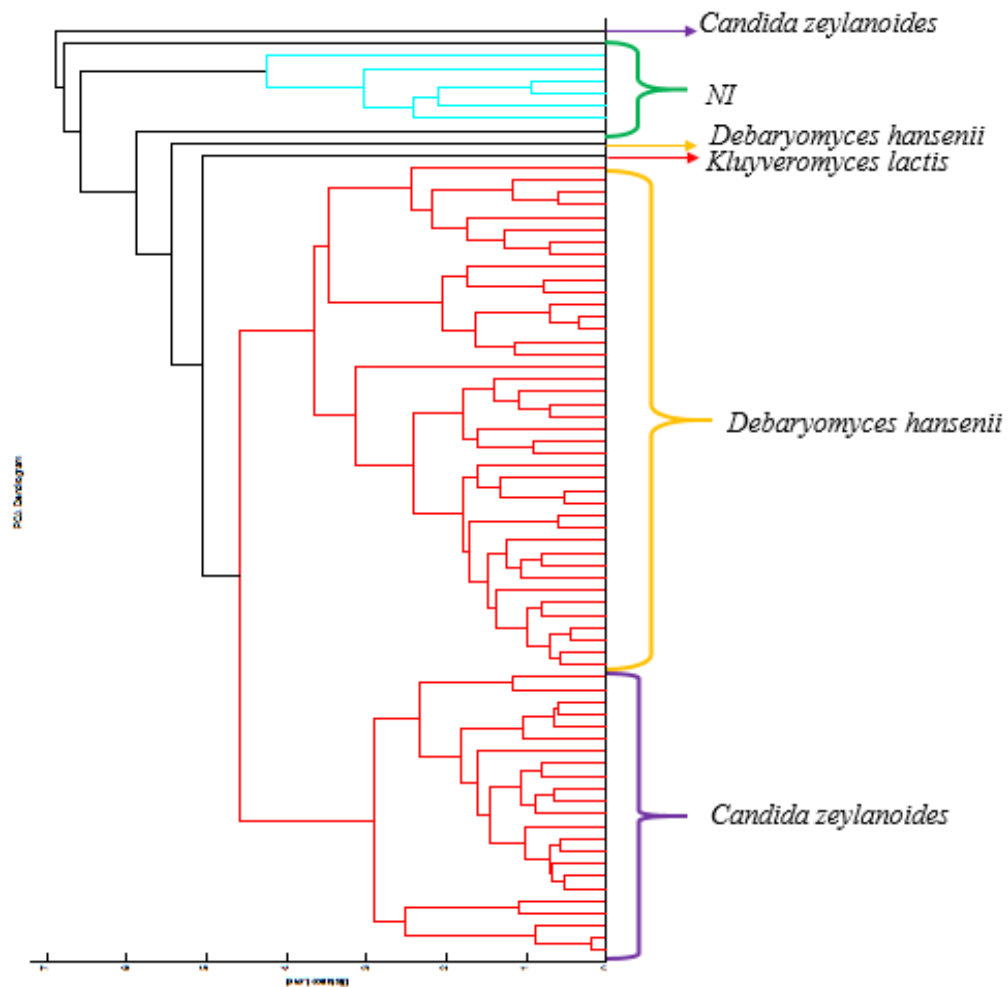


Fonte: Do autor (2019).

A identificação por MALDI-TOF dos isolados de levedura da propriedade 3 (A3), estão apresentados na Figura 15. Os isolados foram identificados à nível de espécie como *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e espécie não identificada (NI), semelhante as espécies de leveduras presentes na amostra 1 e 2, exceto pela ausência da espécie *Yarrowia lipolytica*.

A espécie de levedura identificada com maior população foi *Candida zeylanoides* ($1,31 \cdot 10^7$ UFC/g) (Tabela 5) semelhante a propriedade 2 (A2).

Figura 15 - Dendograma dos isolados de levedura presentes na amostra 3 de QMA do Serro.



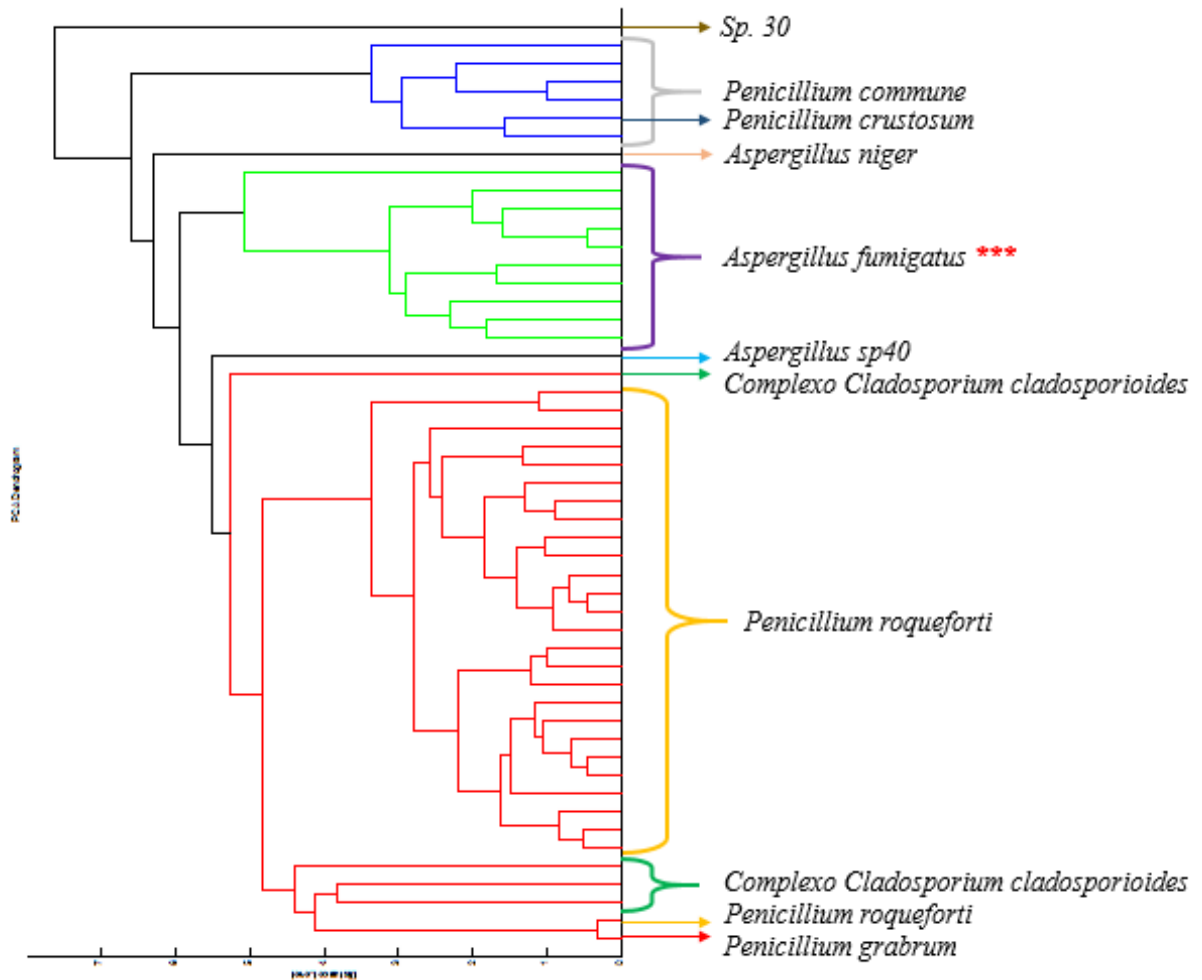
Legenda: NI: Levedura sem identificação. Fonte: Do autor (2019).

Em relação aos fungos filamentosos isolados, foram identificados morfologicamente de acordo com os manuais de identificação e também MALDI-TOF.

Ao analisar o perfil proteico por MALDI-TOF dos isolados de fungos filamentosos da propriedade 1 (A1), apenas a espécie *Aspergillus fumigatus* apresentou identificação confiável (Figura 16). No entanto, a fim de facilitar a observação dos isolados para melhor agrupa-los, cada isolado no dendograma recebeu sua denominação de acordo com a identificação morfológica.

A principal espécie detectada na propriedade 1 foi *Penicillium roqueforti* ($1,52 \cdot 10^6$ UFC/g) (Tabela 5). E nenhum dos isolados identificados, nesta propriedade, como potencialmente toxigênicos de Ocratoxina A, como o *Aspergillus niger*, foi produtor de toxina.

Figura 16 - Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes na amostra 1 de QMA do Serro.

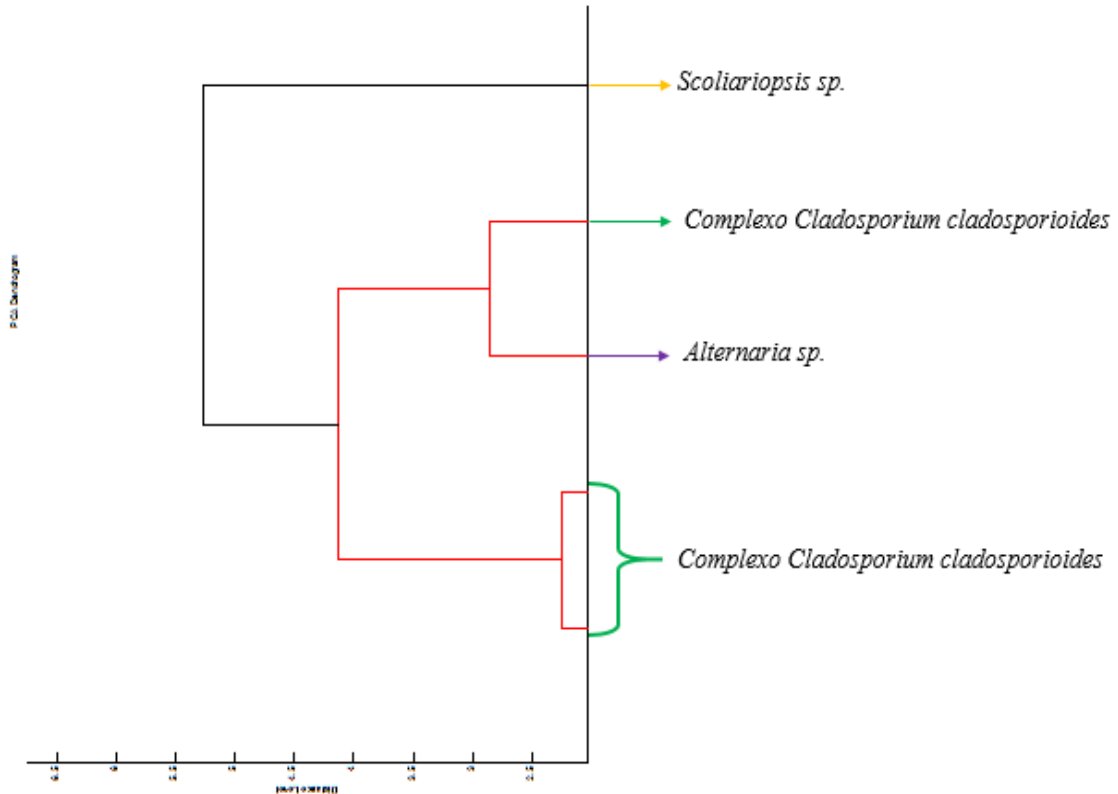


Legenda: *** Identificação pelo MALDI TOF e por morfologia. *Sp.30*: Espécie de fungo filamentoso não identificada. Fonte: Do autor (2019).

Não foi possível identificar os isolados de fungos filamentosos da propriedade 2 (A2) por MALDI-TOF. No entanto, a fim de facilitar a observação dos isolados para melhor agrupá-los, cada isolado no dendograma recebeu sua denominação de acordo com a identificação morfológica (Figura 17).

A espécie com maior população na propriedade 2 (A2) foi *Complexo Cladosporium cladosporioides* ($3,1 \cdot 10^7$ UFC/g) (Tabela 5).

Figura 17 - Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes na amostra 2 de QMA do Serro.



Fonte: Do autor (2019).

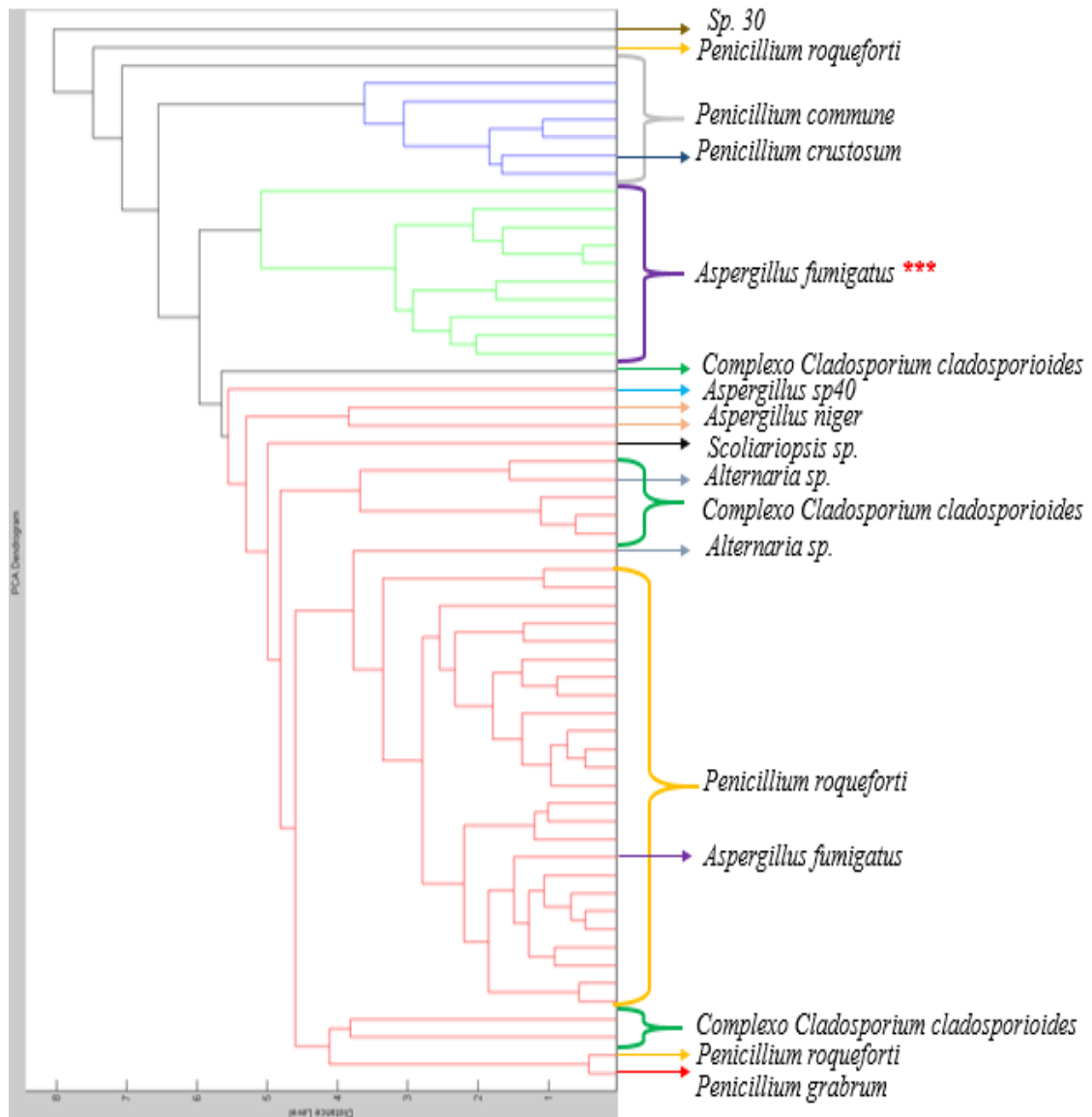
Já em relação a propriedade 3 (A3) houve uma baixa quantificação de fungos filamentosos apenas 1.10^6 UFC/g correspondente a *Alternaria sp.* Desta forma não é apresentado o dendograma da identificação por MALDI-TOF desta propriedade.

As amostras (A2 e A3) apresentaram uma menor quantificação e diversidade de fungos filamentosos respectivamente, em comparação com a amostra A1.

A Figura 18 a seguir mostra o dendograma dos fungos filamentosos isoladas das 3 propriedades (A1, A2 e A3). Com este agrupamento foi possível dimensionar a diversidade de fungos filamentosos da região e não somente das amostras.

Dentre as propriedades a que apresentou a maior diversidade de espécies presente no queijo foi a propriedade 1 (Tabela 5).

Figura 18- Dendograma dos isolados de fungos filamentosos presentes nas amostras 1, 2 e 3 de QMA do Serro.



Legenda: *** Identificação pelo MALDI TOF e por morfologia. Sp.30: Espécie de fungo filamentosos não identificada. Fonte: Do autor (2019).

3.3 Análises físico-químicas do Queijo Minas Artesanal do Serro

Na Tabela 6, observa-se a espessura das cascas e as características físico-químicas das amostras das 3 propriedades referente a massa (A1, A2 e A3) e a casca (A1C, A2C e A3C).

Tabela 6 - Composição físico-química e espessura da casca de 3 amostras de QMA do Serro (valor médio \pm desvio padrão) das 3 propriedades correspondente a casca e a massa dos queijos.

Parâmetros	Amostras (massa do queijo / casca)					
	A1	A1C	A2	A2C	A3	A3C
%NaCl	0,15 \pm 0,07 ^a	0,1 \pm 0 ^a	0,15 \pm 0,07 ^a	0,1 \pm 0 ^a	0,1 \pm 0 ^a	0,1 \pm 0 ^a
%Gorduras	27,5 \pm 9,19 ^a	32,2 \pm 2,54 ^a	32 \pm 2,82 ^a	32,5 \pm 2,12 ^a	33 \pm 1,41 ^a	29,6 \pm 3,67 ^a
%Acidez	2,41 \pm 0,27 ^a	1,82 \pm 0,73 ^a	2,92 \pm 0,12 ^a	6,07 \pm 0,12 ^b	2,26 \pm 0,47 ^a	2,28 \pm 0,37 ^a
%Umidade	32,7 \pm 3,04 ^a	32,62 \pm 2,09 ^a	37,75 \pm 1,48 ^a	37,45 \pm 3,04 ^a	32,7 \pm 4,52 ^a	28,55 \pm 4,17 ^a
Espessura	***	74,58 \pm 11,63 ^a	***	69,3 \pm 1,34 ^a	***	66,42 \pm 0,14 ^a
pH	5,77 \pm 0,43 ^a	6,66 \pm 0,36 ^a	7,07 \pm 0,035 ^a	5,93 \pm 0,014 ^a	5,78 \pm 0,31 ^a	6,37 \pm 0,77 ^a

Legenda: **A1**- massa do queijo da amostra da propriedade 1, **A1C**- casca do queijo da amostra da propriedade 1; **A2**-massa do queijo da amostra da propriedade 2, **A2C**- casca do queijo da amostra da propriedade 2; **A3**-massa do queijo da amostra da propriedade 3, **A3C**- casca do queijo da amostra da propriedade 3. *Letras diferentes na mesma linha mostram diferença estatística significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Onde: *** Não existe medição. Fonte: Do autor (2019).

Para os percentuais de umidade, cloreto de sódio (NaCl), gorduras no extrato seco (GES) e valores de pH, todas as amostra de massa ou casca foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

O único aspecto que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) foi o percentual de ácido láctico (acidez) apenas para a amostra da propriedade 2 (A2C). Sendo estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) para as demais (A1, A1C, A2, A3 e A3C). Os valores para as amostras de massa e casca variaram em ordem crescente: 1,82% (A1C), 2,26% (A3), 2,28% (A3C), 2,41% (A1), 2,92% (A2) e 6,07% (A2C). Sendo o menor percentual para a casca (A1C) e o maior percentual para a casca (A2C).

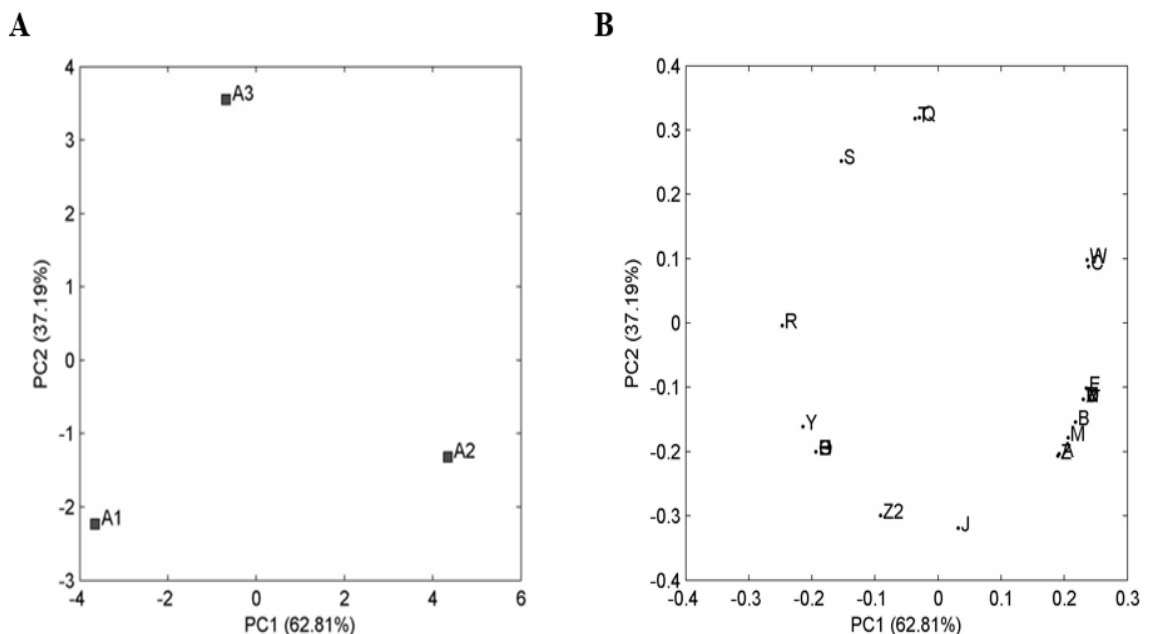
Em relação à espessura (milímetros) da casca dos queijos (A1C, A2C e A3C), foi observado que todas as amostras de casca foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). As medidas das cascas variaram em ordem crescente: 66,42mm (A3C), 69,3mm (A2C) e 74,58mm (A1C).

3.4 Análise de Componentes Principais (PCA)

Os resultados das amostras (A1, A2 e A3) das 3 propriedades produtoras de QMA foram submetidos à análise de componentes principais (PCA), estabelecendo uma correlação entre a diversidade da microbiota identificada com as características físico-químicas das amostras (Figura 19). Pela Figura (A) observamos que todas as amostras de QMA (A1, A2 e A3) diferiram estatisticamente.

Em relação a propriedade 1 (A1) observa-se uma maior ocorrência das leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*. Com destaque para o fungo filamentoso *Scolariopsis sp.* isolado pelo Swab. Em relação aos aspectos físico-químicos, não foi possível estabelecer uma correlação, uma vez que os mesmos estiveram melhores correlacionados com as propriedades 2 e 3 (A2 e A3).

Figura 19 - Análise de Componentes Principais (PCA) da diversidade micológica e sua correlação com as características físico-químicas das amostras A1, A2 e A3 de QMA do Serro.



Legenda: **Figura (A)** Amostras A1, A2 e A3; **Figura (B)** Características físico-químicas e diversidade micológica. Onde: *Scolariopsis sp.* (R), *Aspergillus flavus* (S), *Kluyveromyces lactis* (Y), *Aspergillus japonicum* (T), *Alternaria sp.* (Q), *Yarrowia lipolytica* (Z2), *Aspergillus fumigatus* (J), *Candida zeylanoides* (W), %Gorduras (C), Acidez % ácido láctico (E), %Umidade (B), *Complexo Cladosporium cladosporioides* (M), *Debaryomyces hanseni* (Z), pH (A). Fonte: Do autor (2019).

Para a propriedade 2 (A2) houve uma maior ocorrência dos fungos filamentosos *Complexo Cladosporium cladosporioides* isolado pelo método de diluição seriada e *Aspergillus fumigatus* isolado pelo Swab. Já em relação às leveduras, a maior ocorrência foi de

Debaryomyces hansenii. Os aspectos físico-químicos que estiveram correlacionados com esta amostra foram pH, percentual de umidade e de acidez.

Na a propriedade 3 (A3) percebeu-se como aspecto físico-químico de maior destaque o teor de gorduras. Houve uma maior ocorrência dos fungos filamentosos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus japonicum*, *Scolariopsis sp.* isolados pelo Swab, e também de *Alternaria sp.* isolado pelo método de diluição seriada. Já em relação às leveduras, a maior ocorrência foi de *Candida zeylanoides*.

4. DISCUSSÃO

A legislação brasileira não estabelece padrões de qualidade microbiológica do ar de ambientes de processamento de alimentos (CHAVES et al., 2011), assim como nas queijarias produtoras de QMA. Como se sabe, os microrganismos presentes no ambiente de produção das queijarias, assim como os presentes no leite cru, são importantes para a qualidade do produto, através da atividade de suas enzimas, que podem agir influenciando de maneira positiva ou não, nas características sensoriais típicas do queijo (CASALTA, et al. 2009; DONNELLY et al., 2016). Ressalta-se, a importância dos produtores assumirem os cuidados básicos, garantindo um rebanho saudável para a produção de leite de qualidade. Atentando as boas práticas de manipulação e condições higiênico-sanitárias adequadas na fabricação e no ambiente das queijarias (MINAS GERAIS, 2002; MINAS GERAIS, 2013).

Segundo Andrade (2003) são formados aerossóis nos ambientes de processamento de alimento, constituídos principalmente de esporos de fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Diversos são os fatores que podem contribuir para a contaminação microbiológica do ar desses ambientes, como o próprio sistema de ventilação (ANDRADE et al., 2008). Como os QMAs são produzidos e maturados sob condições naturais não controladas (DELGADO et al., 2016), a influência de fatores abióticos interfere diretamente na incidência dos microrganismos tanto no ambiente externo das queijarias, como no ambiente interno das câmaras de maturação (BERNARDI et al., 2006).

A avaliação da microbiota presente no ar das câmaras de maturação evidenciou uma ocorrência superior de fungos filamentosos, em comparação com as leveduras, atribuído a própria fisiologia destes microrganismos, sugerindo a maior difusão de esporos no ambiente. Como visto, a incidência dos microrganismos no ar é influenciada por fatores abióticos, como as variações da temperatura, umidade relativa do ar, vento, irradiação solar e das estações climáticas (BERNARDI et al., 2006).

Os isolados de levedura identificados no ar à nível de espécie presentes nas propriedades 1 e 3, foi *Trichosporon japonicum*. De acordo com Sugita (1998) que isolaram essa espécie do ar no Japão, as leveduras desse gênero crescem em temperatura ótima de 25°C, compatível com a temperatura de clima temperado da microrregião do Serro (CLIMATE-DATA.ORG, 2019).

Embora não haja relatos na literatura da presença dessa espécie em alimentos, diversas outras espécies do gênero *Trichosporon*, como: *T. cutaneum*, *T. ovoides*, *T. caseorum* e *T. lactis*, consideradas patogênicas, já foram encontradas em produtos lácteos, sendo as duas últimas

isoladas de queijos não maturados e frescos respectivamente (LOPANDIC, 2006; MIDDELHOVEN, 2003).

Entretanto no presente trabalho, não foi encontrada a espécie patogênica *T. japonicum* no QMA do Serro, sugerindo que o queijo pode ser um ambiente inapropriado para seu crescimento. Por ser um ambiente complexo cuja composição em conjunto com as condições sazonais do ambiente promove a seleção de uma microbiota bem definida (JAKOBSEN, 1996), tal fato justifica a ocorrência da espécie apenas do ar das câmaras de maturação.

Algumas das espécies de fungos filamentosos encontradas no ar também se mostraram presentes no QMA, como *Penicillium commune* na propriedade 1, *Scopulariopsis sp.* na propriedade 2, e na propriedade 3 não foi possível uma correlação. Tais resultados sugerem o ar como uma possível fonte de contaminação para o QMA pelos mesmos, visto que estes microrganismos não são relacionados diretamente ao leite, vindo a aparecer no queijo durante o período de maturação. Entretanto, verificou-se que *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium implicatum*, *Aspergillus versicolor* e *Chaetomium sp.*, registrados no ar das câmaras de maturação, não foram encontrados no QMA. Sugerindo que o queijo por se tratar de um ambiente complexo, pode ou não favorecer o crescimento dos fungos presente no ar, podendo ser uma forma de estimular ou inibir o desenvolvimento de determinadas espécies de fungos.

Todas as amostras de QMA das três propriedades apresentaram uma população superior de leveduras. Segundo o autor Viljoen (2003) após avaliar a diversidade de leveduras nos queijos Camembert e Brie produzidos na África do Sul, em diferentes condições sazonais (inverno e verão), constatou que a população de diversas leveduras, dentre elas *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica* tenderam a aumentar constantemente durante um período de 56 dias de maturação em temperaturas mais baixas (inverno/14°C). Fato que pode estar relacionando com a temperatura do ambiente. Tais resultados corroboram com o presente estudo, uma vez que foram observadas altas contagens das mesmas espécies nos queijos maturados no período de inverno.

Embora alguns isolados não puderam ser identificados por MALDI-TOF devido algumas limitações da técnica, como o banco de dados (DINGLE, 2013), foi possível observar algumas leveduras predominantes nas amostras de queijo das 3 propriedades, sendo a espécie *Candida zeylanoides* com maior população isolada entre as amostras de QMAs, seguida de *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*.

Estas espécies são frequentemente relatadas como predominantemente associadas ao queijo e produtos lácteos, *Debaryomyces hansenii* se destacou ao longo do período de 60 dias de maturação, e *Kluyveromyces lactis* foi detectada na maturação mais tardia, com 30 e 60 dias

estando presente em amostras de QMA do Serro (CARDOSO et al., 2015). Lima (2009) isolou leveduras do queijo, pingo, leite e coalhada da Serra do Salitre e também identificou predominantemente *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces lactis*.

Andrade (2017) identificou *Kluyveromyces lactis* entre outras, no QMA da Serra da Canastra. Já em outro trabalho, Borelli (2006) identificou *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces lactis* entre outras, no queijo Canastra e *Candida zeylanoides* foi isolada apenas do leite cru. Lopandic (2006) identificou leveduras associadas a uma diversidade de produtos lácteos, na Áustria, por técnicas tradicionais e moleculares. Dentre a diversidade de espécies isoladas, as mais frequentes foram *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica* e *Candida zeylanoides*. Banjara (2015) avaliou a diversidade da microbiota presentes em uma variedade queijos produzidos em vários países. Identificaram-se predominantemente as espécies: *Debaryomyces hansenii*, seguido de algumas espécies do gênero *Candida*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*.

Portanto, as leveduras encontradas neste trabalho estão relacionadas ao QMA em diferentes regiões. São consideradas benéficas, importantes para o desenvolvimento do sabor e aroma do queijo durante o amadurecimento, devido a produção de compostos gerados principalmente por suas proteases, lipases e atividade de β -galactosidase em conjunto (CARDOSO et al., 2015, ANDRADE et al., 2017, LOPANDIC et al., 2006, BANJARA et al., 2015). *Candida zeylanoides* apresenta atividades enzimáticas importantes e pode influenciar positivamente na qualidade do queijo devido potencial lipolítico e assimilação de citrato (FAADA et al., 2004).

As espécies identificadas neste trabalho *Yarrowia lipolytica* e *Candida Zeylanoides* não tinham sido relatadas no QMA, em trabalhos anteriores. Dentre elas, *Y. lipolytica* presente nas amostras das propriedades 1 e 2, é uma espécie com capacidade promissora para fabricação de queijos, por produzir enzimas extracelulares capazes de modificar as características organolépticas do queijo durante a maturação (FREITAS et al., 1999).

Com o intuito de garantir um isolamento eficiente de fungos filamentosos do QMA, o presente trabalho empregou além da técnica de diluição seriada, o repique direto da casca por Swab, como descrito por Andrade et al., 2008. Nessa avaliação foram observadas algumas diferenças entre a diversidade de fungos encontrados pelas técnicas. Sugerindo, portanto, a importância do uso concomitante das mesmas.

Os isolados de fungos filamentosos do QMA e do ar das câmaras de maturação foram identificados tanto morfológicamente de acordo com os manuais de identificação e pela análise do perfil proteico por MALDI-TOF, como descrito por Lima et al., 2017. Ao analisar o perfil

proteico por MALDI-TOF, apenas duas espécies apresentaram identificação *Aspergillus fumigatus* e *Scolariopsis brevicaulis*, e que condizem com os obtidos pela morfologia. Demonstrando ser uma técnica precisa e rápida, porém não aceitável como único procedimento de identificação, embora auxilie na identificação e agrupamentos dos isolados.

Penicillium e *Aspergillus* são os principais gêneros encontrados em queijos (BANJARA et al., 2015), sendo também os principais encontrados nos QMAs no presente trabalho. Algumas espécies potencialmente produtoras de toxinas foram identificadas por Banjara et al., 2015, dentre elas *Aspergillus niger*. No presente estudo, *A. niger* não produtor de Ocratoxina A, foi identificada em baixa incidência nas amostras da propriedade 1 (A1). Esta espécie, assim como outras espécies pertencentes à seção Nigri como *Aspergillus japonicum*, presente na amostra 3 (A3), podem estar associados com a deterioração de queijos pela ação de suas enzimas hidrolíticas (amilases e lipases) (PERRONE et al., 2004; BAJARA et al., 2015).

Alguns isolados de *Aspergillus flavus* produtores de Aflatoxinas foram identificados nas amostras (A1 e A3). No entanto, a produção de micotoxinas pode mudar sob diferentes fatores, podendo ser intrínseco, como a composição físico-química do queijo (pH, atividade de água (A_w) e teor de NaCl) ou ainda a sua própria composição (fontes de carbono e nitrogênio). E os fatores extrínsecos, incluem temperatura, umidade relativa, atmosfera de armazenamento, tempo de maturação, e ainda fatores bióticos como as interações microbianas (HIMERY, 2014). Portanto, mesmo que os *A. flavus* isolados no presente trabalho sejam potencialmente produtores de Aflatoxinas (B1 e B2), são as condições nas quais estarão submetidos que irá determinar se ocorrerá ou não a produção das mesmas.

O *Aspergillus fumigatus* é uma espécie que pode ser encontrada em diferentes ambientes, inclusive em queijo maturado, como demonstrado por Hayaloglu (2007), na qual isolou esta espécie do queijo Kuflu produzido na Turquia. No presente estudo foi isolado da amostra (A1) de QMA, e trata-se de uma espécie patogênica, potencialmente produtora de micotoxinas como gliotoxina, fumigaclavina, verruculogeno, entre outras (SAMSON, 2010). Consequentemente, pode representar um risco potencial para a saúde pública.

Um dos fungos isolados predominantemente na amostra (A1) *Penicillium roqueforti*, é também uma espécie mundialmente conhecida como cultura de maturação em queijos “azuis”, por desempenhar um papel significativo no desenvolvimento da aparência, textura e sabor pela ação de suas lipases hidrossolúveis. Em outros queijos é considerado um contaminante, podendo contribuir positivamente ou não. Também são conhecidos por sua capacidade de produzir PR-toxina, roquefortina C, ácido micofenólico e andrastina A. Mas a toxina PR é instável no queijo e por isso exibe baixa toxicidade. Além disso, *P. roqueforti* recebeu um status

sendo reconhecido como seguro (GRAS) pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA) (HIMERY, 2014, BANJARA, 2015, PERRY, 2004).

Embora não predominante, *P. crustosum* isolado da amostra (A1) de QMA está entre os fungos filamentosos de origem alimentar de particular importância nas regiões temperadas do mundo, sendo isolados de diferentes alimentos inclusive queijos. Segundo Kokkonen et al. (2005), *P. crustosum* produziu roquefortina C em todos os substratos avaliados em seu estudo, incluindo o análogo de queijo. O autor hipotetizou que a habilidade de *P. crustosum* em produzir este metabólito secundário foi relacionada com o alto teor de proteína no queijo, porque os aminoácidos são necessários para a síntese de micotoxinas. Sendo assim a presença de *P. crustosum* em queijo pode ser considerado como um possível risco para a saúde, porém como relatado anteriormente a produção da micotoxinas depende de muitos fatores.

Algumas espécies identificadas neste trabalho, já foram observadas em estudos anteriores (HOCKING et al., 1992; SURANSKÁ et al., 2016) relacionadas com a deterioração de queijos. Dentre elas, *Cladosporium cladosporioides* presente nas amostras (A1 e A2), *Penicillium commune* e *Penicillium glabrum* presentes na amostra (A1), são contaminantes encontrados não só em queijo, mas em diversos ambientes. *Penicillium commune*, está entre os contaminantes mais comuns associados com estragos, como a descoloração na superfície do queijo e modificação do sabor, além de ser potencialmente produtor de ácido ciclopiazônico (CPA) (BANJARA, 2015; HIMERY, 2014; HOCKING, 1997).

Outros gêneros que podem ser prejudiciais as características do QMA, identificadas neste trabalho, já foram relatadas em estudos anteriores de outros países. De acordo com Marcellino et al. (2014) diversas espécies do gênero *Scopulariopsis spp.* podem contaminar muitas classes de queijo, provocando defeitos como a destruição da integridade da casca, e alterações do sabor, pela ação de suas enzimas proteolíticas. As espécies frequentemente associadas aos queijos são *Scopulariopsis fusca* e *Scopulariopsis brevicaulis*. No presente estudo, o gênero *Scopulariopsis spp.* foi presente nas amostras (A1 e A2) e a espécie *Scopulariopsis brevicaulis* foi identificada no ar da câmara de maturação da propriedade 2.

O *Geotrichum candidum* embora não predominante, foi identificado na amostra (A2), e apresenta importantes contribuições positivas para o queijo, pois afetava a bioquímica durante o amadurecimento pela ação de suas lipases e proteases na matriz de queijo, contribuindo com o sabor, aroma e ainda neutralizando a acidez da coalhada produzida pelas bactérias do ácido láctico (HAYALOGLU, 2007). É uma espécie que pode ser encontrada em diferentes ambientes, mas é característica de produtos lácteos, comumente encontrada como parte da microbiota do leite cru. Além de suas contribuições para as propriedades organolépticas do queijo, pode ainda

atuar inibindo certos fungos micotoxigênicos como *Aspergillus flavus* e espécies indesejáveis de *Penicillium* entre os quais se encontra *P. commune* (MARCELLINO, 2014). Desta forma a presença *Geotrichum candidum* na amostra (A2), pode ter colaborado para evitar a presença de espécies contaminantes.

Como visto, o *Aspergillus versicolor* foi uma das espécies isoladas no ar da câmara de maturação da propriedade 1. Embora não predominante no ar e não correlacionada com as espécies encontradas no QMA neste trabalho, chama a atenção. Pelo fato de ser uma das poucas espécies do gênero *Aspergillus* capaz de produzir esterigmatocistina (STC), que é um xanthone estruturalmente similar a Aflatoxina; no entanto, menos tóxico. Essa micotoxina já foi relatada em outros trabalhos, presente em queijos durante a maturação e também no ar das salas de maturação, contaminados por *A. versicolor* (HIMERY, 2014, LUND, 1995).

Diversos são os fatores que influenciam na tipicidade de um queijo. E assim, apresentam uma composição físico-química heterogênea com gradientes de NaCl, pH, Aw (atividade de água) que podem variar na superfície (casca) e no núcleo (massa), assim como a microbiota durante o processo de maturação (HIMERY, 2014). O conhecimento da microbiota e das características físico-químicas auxiliam para descrição de tipicidade de um queijo. Além disso, as características físico-químicas do queijo estão sujeitas à alterações durante o amadurecimento, e influenciam na produção de micotoxinas (CASQUETE, 2018). Entender como a dinâmica microbiana se relaciona com as características físico-químicas, e consequentemente na produção das micotoxinas, é fundamental, para prever estratégias de adequação.

Avaliou-se diferentes parâmetros físico-químicos (umidade, pH, NaCl, gordura e acidez) nas amostras das 3 propriedades. De acordo com a Portaria nº 146, de 7 de março de 1996, que aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos (BRASIL, 1996), as amostras das propriedades 1 e 3 (A1, A1C, A3 e A3C) são classificadas como queijos de baixa umidade até 35,9% ou queijos de massa dura. Já para a casca e para a massa da amostra 2 (A2C e A2), como queijo de média umidade (geralmente conhecidos como queijos de massa semidura): umidade até 45,9%. Tal resultado, sugere que a amostra 2 mostrou-se susceptível ao crescimento de fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium* e de leveduras como *Debaryomyces hansenii*, devido ao alto teor de umidade. Pelo fato de ser um processo artesanal, sem condições controladas, o teor de umidade assim como outros parâmetros, se torna difícil de controlar (OLIVEIRA, 2013).

Vale ressaltar que foram observados menores valores de umidade para as cascas nas mesmas amostras. No entanto, as classificações de umidade para as amostras das 3 propriedades

se mantiveram, e atenderam as exigências da legislação (MINAS GERAIS, 2008), que preconiza um teor de umidade inferior a 45,9%.

Quanto ao percentual de gorduras, todas as amostras foram classificadas como queijos semi-gordo (25 a 44,9% de gorduras no extrato seco) de acordo com a Portaria nº 146/1996 (BRASIL, 1996), sendo observada pouca variação de percentuais entre a casca e a massa das mesmas amostras. Tal resultado também foi relatado por Machado (2004) nos QMA do Serro, que observou um percentual médio de gordura de 29,22%, classificando-os como semi-gordos. Apesar de poucas variações, a amostra com maior teor de gordura (amostra 3), se mostrou mais susceptível a contaminação de fungos filamentosos como *A. flavus*, *A. japonicum*, *Scopulariopsis*, e pela levedura *Candida zeylanoides*.

O único aspecto composicional que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) foi o percentual de ácido láctico (acidez) apenas para a casca da amostra 2 (A2C) onde observou-se o maior teor. A acidez é um importante parâmetro proveniente do ácido láctico produzido a partir da degradação da lactose pelas bactérias, e afeta de maneira direta o pH. Com isso, influencia o crescimento de microrganismos e a atividade enzimática ao longo da maturação. Alguns pesquisadores justificam que as variações encontradas em diferentes trabalhos decorrem devido a contagem de bactérias fermentadoras da lactose, presentes no leite cru, assim como de variações no processo de fabricação, principalmente nas etapas de prensagem e de salga. Além disto, há variações na quantificação de bactérias lácticas no pingo, tendo em vista que é um inóculo natural composto por bactérias nativas e não padronizado (VALE, 2018; FIGUEIREDO, 2015). Tal resultado, sugere que a amostra 2 mostrou-se susceptível ao crescimento de fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium* e de leveduras como *Debaryomyces hansenii*, devido a fatores como o alto percentual de ácido láctico.

Embora seja comum observar em outros estudos de QMA variações do teor de sal, devido à falta de padronização utilizada no queijo, mesmo se tratando do mesmo lote (SOBRAL, 2017). Os percentuais de NaCl de ambas as amostras tanto para a casca como para a massa foram semelhantes entre uma faixa de 0,10% à 0,15%, não estabelecendo uma correlação com nenhuma espécie encontrada nas amostras. Segundo Ferreira (2008), o sal regula a atividade enzimática em diversos níveis, afetando o crescimento bacteriano e a proteólise. Assim, baixas concentrações de cloreto de sódio podem além de influenciar no sabor, torná-lo mais susceptível à contaminação microbiológica.

Os valores de pH encontrados mostram-se variáveis para a casca e a massa. Para a casca observamos uma faixa de pH 5,93 à pH 6,66 e para a massa uma faixa de pH 5,77 à pH 7,07, entre as amostras. Vale (2018) observou que os valores de pH foram aumentando ao longo da

maturação, apresentando uma média de pH 5,09 ao final de 31 dias de maturação. O autor justifica que essas variações podem ocorrer devido a degradação proteica proveniente da atividade de enzimas coagulantes que estão naturalmente presentes no leite (plasmina), enzimas de bactérias lácticas não starters (NSLAB) ou enzimas de bactérias lácticas presentes no soro fermento (pingo). Resultando em compostos nitrogenados alcalinos, contribuindo para o aumento de pH. Visto que, as amostras deste trabalho apresentavam entre 30 e 45 dias de maturação, os maiores valores de pH podem ser justificados. Tal resultado, sugere que o alto valor de pH, como observado na amostra 2, mostrou-se susceptível ao crescimento de fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium* e de leveduras como *Debaryomyces hansenii*.

Casquete (2018) avaliou a influência da atividade da água (*aw*), pH e temperatura, no crescimento e produção de ácido ciclopiazônico (CPA), pelas espécies *Penicillium commune* e *P. camemberti*, usando um modelo de queijo sintético (meio de cultura), a fim de minimizar a possível contaminação por CPA do queijo. Em geral, a produção de CPA, foi significativamente afetada pelos diversos fatores, assim como o tempo de crescimento. Aos 12 dias de crescimento, a produção de CPA para o *P. commune* foi estatisticamente muito maior. E a máxima produção ocorreu em pH 5,0 (mas também significativa em pH 6), 0,95 *aw*, e nas temperaturas 25°C ou 30 ° C. Considerando que *P. commune* também foi encontrada no presente trabalho na amostra (A2). E que as condições de temperatura ambiente do Serro é em média 25°C, e os valores de pH para a casca e a massa de A2 foram de pH 6,66 e 5,77, respectivamente. A referida espécie pode apresentar riscos, pela possível produção de CPA.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo forneceu uma visão mais clara da microbiota presente no QMA e nas câmaras de maturação, confirmando que a diversidade pode variar de propriedade para propriedade. As leveduras predominaram no QMA, e os fungos filamentosos se destacaram nos ambientes de maturação, na qual o ar pode ser uma das fontes de contaminação para os queijos. Ressalta-se, que pelo o fato do queijo ser um ambiente complexo, a incidência dos microrganismos no QMA, principalmente de fungos filamentosos, variou consideravelmente entre as propriedades.

A descrição da microbiota permitiu reconhecer o QMA do Serro, como um produto seguro para o consumo, pela alta incidência de leveduras benéficas e pelo *Geotrichum candidum*, que contribuem para as características organolépticas do queijo. Apesar da presença constatada de alguns fungos filamentosos deterioradores, que não oferecem riscos à saúde e de espécies potencialmente micotoxigênicos. As baixas quantificações e ainda, a dependência de fatores bióticos e abióticos para que ocorra a produção da toxina, não oferece risco comprovado.

Portanto, é importante que os produtores assumam sempre os cuidados básicos, atentando as boas práticas de manipulação e condições higiênico-sanitárias adequadas na fabricação e no ambiente das queijarias, a fim de produzir produtos de qualidade.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. ed. Varela, São Paulo, 412 p. 2008.
- ANDRADE, N. J.; SILVA, R. M. M.; BRABES, K. C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Revista Ciências Agrotécnicas**, Lavras. v. 27, n. 3, p. 590-596, 2003.
- ANDRADE, R. P. et al. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food research international**, v. 91, p. 72-79, 2017.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2006.
- ARAGÃO, M. O. P. **Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em Queijo Minas Artesanal das microrregiões do Serro e Serra da Canastra**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2018.
- BANJARA, N.; SUHR, M.J.; HALLEN-ADAMS, H.E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. **Current microbiology**, 70(6), 792-800. 2015.
- BEMFEITO, R.M. Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**. Vol. 99 No. 10, 2016.
- BERNARDI, E.; COSTA, E. L. G.; NASCIMENTO J. S. Fungos anemófilos e suas relações com fatores abióticos, na praia do Laranjal, Pelotas, RS. **Rev. Biol. Ciências da Terra**, v. 6, p. 234-239, 2006.
- BONY, E.; STRAUB, C.; et. al. Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. PLoS One 10, e0124360. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>. 2015.
- BORELLI, B.M.; FERREIRA, E.G.; LACERDA, I.C.A. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.22, p.1115-1119, 2006.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dez de 2006**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, DF, 2018. Disponível em:
<<https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2016/03/Instru%C3%A7%C3%A3o-normativa-n%C2%B0-68-de-12-dezembro-de-2006.pdf>> Acesso em: 10 de Janeiro de 2019.
- BRASIL. **Portaria nº 146, de 7 de março de 1996**. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, 1996. Disponível em:
<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>> Acesso em 15 de janeiro de 2019.
- CARDOSO, V. M. et al. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69, p. 331-340, 2015.

CASALTA, E. et al. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. **International journal of food microbiology**, v. 133, n. 3, p. 243-251, 2009.

CASQUETE, R. et.al. Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. **LWT - Food Science and Technology**. 89: 179–185, 2018.

CHAVES, K. F. Avaliação microbiológica de ambientes de diferentes laticínios da região de Rio Pomba-MG. **Rev. Inst. Latic.** Mai/Jun, n° 380, 66:11-15, 2011.

CLIMATE-DATA.ORG, 2018. **Dados climáticos para cidades mundiais**. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/>> Acesso em: 03 de janeiro de 2019.

DELGADO, J. et al. Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. **Current Opinion in Food Science**, v. 11, p. 40-45, 2016.

DINGLE, T. C.; BUTLER-WU, S. M. MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. **Clin Lab Med**, v. 33, p. 589-609, 2013.

DINIZ, M.F.S. **Queijo Canastra: um estudo envolvendo aspectos culturais e parâmetros de inocuidade do alimento**. Dissertação de mestrado apresentada a Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 2013.

DONNELLY, C.; KEHLER, M. **The Oxford companion to cheese**. Oxford University Press, 2016.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **EMATER**. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>>. Acesso em: 02 jan. 2019.

FAADA, M. E. et. al. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. **Int. journal of Food Microbiology**. 95. 51-99. 2004.

FERREIRA, D. F. et. al. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FERREIRA, W.F.; FILHO, J.R.F. Avaliação da qualidade físico-química do queijo coalho comercializado no Município de Barreiros –PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v.02, n.01, p. 127-133, 2008.

FIGUEIREDO, S. P. et al. Características do leite cru e do Queijo Minas Artesanal do Serro em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**. v.20, n.1, p. 68-82, 2015.

FIGUEIREDO, S.P. **Características do leite cru e do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais, e produção de queijos com doces** / Sylvania Pereira de Figueiredo. – Diamantina: UFVJM, 2014. 108 p.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Chemistry and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks. **In: Dairy Chemistry and Biochemistry**. London U. K. Blackie Academic & Professional. Cap.10, p.403–418. 1998.

- FREITAS, A.C.; PINTADO, A.E.; PINTADO, M.E. et al. Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis. **Int. Dairy J.**, v.9, p.593-603, 1999.
- GOMES, A. P. et al. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. **Journal of Dairy Science**. v. 94(6), p. 2701-2706, 2011.
- HARBUTT, J. (Org). O livro do queijo. **São Paulo: Globo**. 2010. 352 p.
- HAYALOGLU, A. A. et. al. Microbial quality and presence of moulds in Kflu cheese. **International J. of Food Microbiology**. 115: 376-380. 2007.
- HOCKING, A D. Understanding and controlling mould spoilage in cheese. **Australian Journal of Dairy Technology; Melbourne**. Vol. 52, Ed. 2. 123-124. 1997.
- HOCKING, A. D. et. al. Fungi causing thread mould spoilage of cacuum packaged Cheddar cheese during maturation. **International J. of Food Microbiology**. 16: 123- 130. 1992.
- HYMERY, N. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. **Institute of Food Technologists**. Vol 13. 2014.
- INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA (IMA). **Queijo Minas Artesanal**. Belo Horizonte. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/certificacao/queijo-minas-artesanal-link>>. Acesso em: setembro de 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. SEBRAE (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS). **Guia de implementação de indicações geográficas para produtos**: orientações para o desenvolvimento de projetos para o reconhecimento de uma indicação geográfica no INPI. 86p. Brasília, 2011.
- JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International dairy journal**, v. 6, n. 8-9, p. 755-768, 1996.
- KLICH, M.A. Identification of common Aspergillus species. **Centraalbureau voor schimmelcultures**. 2002.
- KOKKONEN, M. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. **Int. J. Food Microbiol**. 99:207–14. 2005.
- LESLIE, J.F.; Summerell, B.A. The Fusarium Laboratory Manual. **Ames:Blackwell Publishing**, 2006.
- LIMA, C. D. L. C. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n1, p.266-272, 2009.
- LIMA, N.; SANTOS, C. MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. **Current Opinion in Food Science**. 13:26–30. 2017.
- LOPANDIC, K. et al. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, v. 23, p. 341-350, 2006.
- LUND, F. et. al. Associated microflora of cheese. **Food Microbiology**. 12: 8 173–180. 1995.

- MACHADO, E.C. et.al. Características Físico-Químicas e sensoriais do Queijo Minas Artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(4): 516-521. 2004.
- MARCELLINO, N.; BENSON, D. R. The good, the bad, and the ugly: tales of mold-ripened cheese. In: Cheese and Microbes. **American Society of Microbiology**, p. 95-131, 2014.
- MIDDELHOVEN, W. J. Identification of clinically relevant *Trichosporon* species. **Mycoses**, v. 46, n. 1-2, p. 7-11, 2003.
- MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: **Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002**. Disponível em <http://www.almg.gov.br/>. Acessado em setembro de 2018.
- MINAS GERAIS. **Instituto Mineiro de Agropecuária**. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. Diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal.
- MINAS GERAIS. Decreto nº 44.864, de 1º de agosto de 2008. Altera o Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. **Minas Gerais**, Belo Horizonte, 02 ago. 2008. Diário do executivo, p. 1.
- OLIVEIRA, D. F. et al. Caracterização físico-química de Queijos Minas Artesanal produzidos em diferentes microrregiões de Minas Gerais. **Oikos: Revista Brasileira de Economia Doméstica**, Viçosa, v. 24, n.2, p. 185-196, 2013.
- OLIVEIRA, M. M. E. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102-110, 2015.
- PERRONE, G. PCR assay for identification os *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicas*. **European J. of the Plant. Pathology**. 110: 641-649. 2004.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. 27, 293. 2004.
- PINHEIRO, A. C. M.; NUNES, C. A.; VIETORIS, V. SensoMaker: a tool for sensorial characterization of food products. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 3, p. 199-201, 2013.
- PITT, J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species, Sydney. **Food Science Australia**, 2000. 187 p.
- SANSOM, A.; HOESKSTRA, E.S.; FRISVALD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-bourne fungi. 4th ed. Centraalbureau voor schimmel cultures. **Baarn and Delft**. 1995.
- SAMSON, R. A. et al. **Food and indoor fungi**. CBS laboratory manual series 2. **CBS-Fungal Biodiversity Centre**, 2010.
- SANTOS, A.S. **Queijo minas artesanal da microrregião do Serro-MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação**. Diamantina: UFVJM, 2010. 67p.
- SILVA, J. G. et al. Influência do fermento endógeno nas características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 34, n. 273, p. 7-13, mar./abr. 2013.

SOBRAL, D.; et.al. Major defects in artisanal Minas cheese: a review. **Rev. Inst. Laticínios**. v. 72, n. 2, p. 108-120, abr/jun, 2017.

SUGITA, T.; NAKASE, T. *Trichosporon japonicum* sp. nov. isolated from the air. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n.48, p. 1425-1429, 1998.

SURANSKA, H. Characterisation of the yeast and mould biota in traditional white pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques. **Folia Microbiol.** 61:455-463. 2016.

VALE, R. C. et. al. Influence of the type of ferment in the physicochemical characteristics of cheese Minas artisanal do Serro – Minas Gerais, matured in controlled conditions. **Rev. Inst. Laticínios**. Juiz de Fora, v. 73, n. 2, p. 82-90. 2018.

VILJOEN, B. C.; KHOURY, A. R.; HATTINGH, A. Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses. **Food Research International**, v. 36, n. 3, p. 275-283, 2003.