FABIANA REGINA LIMA

SEGURANÇA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DE CASCA FLORIDA NATURAL: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

LAVRAS – MG

2025

FABIANA REGINA LIMA

SEGURANÇA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DE CASCA FLORIDA NATURAL: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

Profa. Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães

Coorientadora

LAVRAS - MG

2025

Ficha catalográfica elaborada pela Catalogação da Biblioteca Universitária da UFLA

Lima, Fabiana Regina.
Segurança do Queijo Minas artesanal de casca florida natural: caracterização da microbiota fúngica e validação de métodos analíticos para determinação de micotoxinas / Fabiana Regina Lima. - 2025.
107 p. : il.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.
Coorientador(a): Elisângela Jaqueline Magalhães.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2025.
Bibliografia.

1. Queijo artesanal. 2. Diversidade fúngica. 3. Micotoxinas. I. Batista, Luís Roberto. II. Título.

Ficha elaborada por André Felipe Calsavara (CRB6/3137)

FABIANA REGINA LIMA

SEGURANÇA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DE CASCA FLORIDA NATURAL: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

SAFETY OF NATURAL BLOOMY RIND ARTISANAL MINAS CHEESE: CHARACTERIZATION OF FUNGAL MICROBIOTA AND ANALYTICAL METHOD VALIDATION FOR MYCOTOXIN DETERMINATION

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 23 de janeiro de 2025.
Dr. Luís Roberto Batista UFLA
Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães UFLA
Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA
Dra. Vivian Machado Benassi UFVJM
Dra. Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira FUNED

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

Profa. Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães

Coorientadora

LAVRAS - MG

2025

À minha família, meu porto seguro,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que me sustentou em cada etapa desta caminhada. Hoje compreendo que cada desafio superado fazia parte do plano perfeito que Ele preparou para mim.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos e às agências FAPEMIG e CNPq pelos recursos para elaboração do trabalho.

Ao professor Luís Roberto Batista e à professora Elisângela Jaqueline Magalhães pela orientação, oportunidade, ensinamentos, paciência e confiança prestados.

À pesquisadora Fabiana Passamani pela orientação, paciência, dedicação, doses diárias de motivação e, principalmente pela amizade.

Aos professores Luiz Ronaldo de Abreu e Ludwig Heinrich Pfenning, pela solicitude, colaboração inestimável na pesquisa e pelos ensinamentos compartilhados.

À Cleuza, do Laboratório de Leite e Derivados, pela ajuda com as análises.

À Fundação Ezequiel Dias e ao Laboratório de Micotoxinas pela valiosa parceria neste trabalho, em especial ao Rafael, Fabiano, Raquel, Flávia, Hamida, Daniela e Mariana pela receptividade, apoio, conhecimentos compartilhados e dedicação.

À banca pela disponibilidade de avaliação deste trabalho.

Aos produtores de Queijo Minas Artesanal de Diamantina, pela confiança, acolhimento e pelo fornecimento das amostras essenciais para a realização desta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos, em especial a Lucy, Nádjla, Thalissa, Kátia, Miriam, Giovana, Kelly, Michele, Cristiane e Harisson, pela parceria, amizade e momentos compartilhados em nossos cafés da tarde.

Às alunas de Iniciação Científica, Júlia, Giovana e Mariana pela contribuição para este trabalho.

Aos meus pais, irmãos e amigos pelo incentivo, apoio, compreensão diante das minhas ausências e pelos momentos compartilhados. Sou imensamente grata por tê-los ao meu lado!

À Alvair, minha segunda mãe, pela generosidade, apoio e compreensão dedicados ao longo desta trajetória.

Agradeço especialmente ao meu noivo, Marcos Júnior, pelo amor, paciência e apoio constante durante todo o processo. Sua presença foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta tese se tornasse realidade, o meu

MUITO OBRIGADA!

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes.”
Isaac Newton

RESUMO GERAL

Os queijos artesanais são muito apreciados no Brasil, sendo o estado de Minas Gerais destaque na produção de grande diversidade desse produto, como o Queijo Minas Artesanal (QMA). O modo de produção tradicional do QMA, passado entre gerações, apresenta grande importância cultural e histórica no contexto mineiro, sendo hoje reconhecido como Patrimônio Imaterial da Humanidade. O Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural (QMACFN) se caracteriza pela presença predominante de fungos brancos que se desenvolvem em sua superfície durante o processo de maturação. Por ser produzido e maturado de forma artesanal, este queijo esta suscetível à ação de diferentes microrganismos provenientes do ambiente e da matéria-prima, como espécies importantes para a geração de atributos sensoriais importantes, mas também existe a possibilidade da presença de espécies toxigênicas. Este trabalho teve como objetivo investigar a influência sazonal na composição físico-química e da micobiota do QMACFN assim como das tábuas de maturação utilizadas na produção. Paralelamente, foi realizada a validação de métodos analíticos para a determinação de micotoxinas em queijos artesanais, bem como a análise da sua ocorrência, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre a segurança e qualidade desse produto artesanal e tradicional. Os resultados obtidos demonstraram que a diversidade fúngica foi maior durante a estação chuvosa. Nessa estação, as tábuas foram dominadas por *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Geotrichum candidum* e *Diutina catenulata*. No período seco, prevaleceram *G. candidum*, *D. catenulata*, *Kodamaea ohmeri* e *Cladosporium cladosporioides*. As espécies *G. candidum*, *D. catenulata* e *Kluyveromyces lactis* foram predominantes na casca e na massa dos queijos durante as duas estações. A sazonalidade influenciou parâmetros físico-químicos, como teor de gordura e atividade de água. Os métodos otimizados e validados para a determinação de micotoxinas demonstraram conformidade com os critérios de validação, sendo eficazes para o monitoramento de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) e ocratoxina A em QMACFN. A aplicação do método em amostras reais mostrou a ausência de micotoxinas detectáveis nas condições avaliadas. Esses resultados destacam a importância da atenção dos produtores às boas práticas agropecuárias e de fabricação, destacando o controle ambiental durante o processo de maturação na busca da minimização do risco de contaminação por fungos toxigênicos e produção de queijos seguros e de alta qualidade. Mesmo com a ausência das micotoxinas nas amostras avaliadas, faz-se necessário o monitoramento contínuo destes contaminantes devido ao risco potencial de contaminação. Dessa forma, este estudo contribui significativamente para a segurança alimentar e para a preservação da qualidade QMACFN servindo como base para a definição de regulamentações específicas sobre limites máximos toleráveis para esses contaminantes no produto. Os resultados obtidos ampliam o conhecimento sobre os fatores que influenciam a qualidade e segurança do QMACFN e reforçam a relevância de monitorar os processos produtivos, promovendo práticas que equilibrem as características sensoriais do queijo com a garantia de segurança alimentar.

Palavras-chaves: Queijo artesanal. Diversidade fúngica. Ocratoxina. Aflatoxina. Métodos analíticos.

GENERAL ABSTRACT

Artisanal cheeses are highly esteemed in Brazil, with the state of Minas Gerais standing out for its production of a wide variety of these products, such as the Artisanal Minas Cheese (AMC). The traditional production methods of AMC, passed down across generations, hold cultural and historical importance in Minas Gerais, and are recognized as Intangible Cultural Heritage of Humanity. The Natural Bloomy Rind Artisanal Minas Cheese (NBRAMC) is characterized by the predominant presence of white fungi that develop on its rind during the ripening process. As it is produced and ripened using artisanal methods, this variety of cheese is influenced by microorganisms from the environment and raw materials. While some of these microorganisms contribute to essential sensory attributes, there is also the potential for the presence of toxigenic species. The aim of this study was to characterize the seasonal influence on the physicochemical composition and microbiota of NBRAMC, as well as the microbiota of wooden boards used for cheese ripening. Concurrently, the study validated analytical methods for mycotoxin detection in artisanal cheeses and analyzed their occurrence, advancing knowledge regarding the safety and quality of this traditional product. The results showed higher fungal diversity during the rainy season, with the wooden boards dominated by *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Geotrichum candidum*, and *Diutina catenulata.* During the dry season, *G. candidum, D. catenulate, Kodamaea ohmeri, and Cladosporium cladosporioides* predominated. Overall, the species *G. candidum*, *D. catenulata*, and *Kluyveromyces lactis* were predominant in the rind and core of the cheeses during both seasons. Seasonality influenced physicochemical parameters, such as fat content and water activity. Furthermore, the optimized and validated methods for mycotoxin detection met the validation criteria, proving effective for monitoring aflatoxins (B1, B2, G1, G2, and M1) and ochratoxin A in NBRAMC. The application of the methods to real samples showed no detectable mycotoxins under the evaluated conditions. These results emphasize the importance of Good Agricultural and Manufacturing Practices, with a particular focus on environmental control during the ripening process, to minimize the risk of contamination by toxigenic fungi and ensure the production of safe, high-quality cheeses. Although no mycotoxins were detected in the evaluated samples, continuous monitoring of these contaminants is crucial due to the potential risk of contamination. Therefore, this study significantly contributes to food safety and the preservation of NBRAMC quality, offering a foundation for establishing specific regulations on maximum permissible limits for these contaminants in the product. The findings enhance our understanding of the factors influencing NBRAMC's quality and safety, emphasizing the need to monitor production processes and promote practices that balance the cheese's sensory characteristics with food safety assurance.

Key-words: Artisan cheese. Fungal diversity. Ochratoxin. Aflatoxin. Analytical methods.

INDICADORES DE IMPACTO

Este estudo gerou impactos significativos em diversas áreas refletindo diretamente na população e locais envolvidos. A contribuição deste trabalho para o aspecto social se justifica na garantia da segurança alimentar e saúde pública em função da validação de métodos para detecção de micotoxinas em queijos artesanais. A pesquisa também buscou incentivar a aplicação de boas práticas agropecuárias e de fabricação pelos produtores, beneficiando as comunidades envolvidas na produção artesanal e aumentando a confiança dos consumidores. Em relação ao aspecto tecnológico, o estudo permitiu a implementação de métodos avançados de monitoramento da qualidade dos queijos, além de aprofundar o entendimento sobre a diversidade fúngica na produção do queijo Minas artesanal. A melhoria na qualidade do queijo leva à competitividade no mercado, expandindo as vendas e criando novas oportunidades, especialmente em Minas Gerais, onde a produção de queijo é essencial. Na esfera cultural, o presente estudo fortalece a preservação do Queijo Minas Artesanal, reconhecido como Patrimônio Imaterial da Humanidade, e assegura que as tradições de sua produção artesanal sejam mantidas sem comprometer a segurança alimentar. Dessa forma, ao promover o equilíbrio entre inovação e tradição, o estudo contribui para a valorização do produto artesanal, beneficiando os pequenos produtores e a economia local. As informações geradas neste trabalho, servem como base para a implementação de políticas públicas para o desenvolvimento de normatizações e legislações no estado de Minas Gerais e promovem a integração da segurança alimentar com a valorização cultural e econômica.

IMPACT INDICATORS

This study has generated significant impacts in a number of areas, reflecting directly on the population and places involved. The contribution of this work to the social aspect is justified by the guarantee of food safety and public health due to the validation of methods for detecting mycotoxins in artisanal cheeses. The research also sought to encourage the application of good agricultural and manufacturing practices by producers, benefiting the communities involved in artisan production and increasing consumer confidence. With regard to the technological aspect, the study enabled the implementation of advanced methods for monitoring cheese quality, as well as deepening our understanding of fungal diversity in the production of artisanal Minas cheese. Improving cheese quality leads to competitiveness in the market, expanding sales and creating new opportunities, especially in Minas Gerais, where cheese production is essential. In the cultural sphere, this study strengthens the preservation of Artisanal Minas Cheese, recognized as Intangible Heritage of Humanity, and ensures that the traditions of its artisanal production are maintained without compromising food safety. In this way, by promoting a balance between innovation and tradition, the study contributes to the valorization of the artisanal product, benefiting small producers and the local economy. The information generated in this study serves as a basis for the implementation of public policies for the development of artisanal products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Microrregiões reconhecidas como produtoras do QMA.....16
Figura 2- QMA da região de Diamantina, MG, em processo de maturação.....19
Figura 3 - Estrutura química das principais aflatoxinas e da ocratoxina A.....23

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figura 1 - Representação das amostras coletadas nas propriedades A1, A2 e A3 durante estação chuvosa (EC) e estação seca (ES) nos municípios localizados na região de Diamantina, no estado de Minas Gerais (MG), Brasil.....42
Figura 2 - Abundância relativa das espécies fúngicas identificadas nas amostras de casca e massa de queijo (A) e nas tábuas de maturação (B) durante as estações seca e chuvosa.....46
Figura 3 - Mapa de calor referente à correlação entre comunidades fúngicas e aspectos físico-químicos dos queijos avaliados durante estação seca (A) e chuvosa (B).....55

ARTIGO 2

Figura 1 - Cromatograma de uma amostra branca de QMA enriquecida com AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA (11 μg/kg) e AFM1 (4,41 μg/kg) 73
Figura S1 - Cromatograma obtido para análise de AFM1 em uma das amostras de QMACFN coletadas.....83

ARTIGO 3

Figura 1 - Cromatogramas HPLC-FLD de uma amostra de QMA branca fortificada com 9 μg/kg para aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (A) e 37,65 μg/kg para OTA (B).....94

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1 - População fúngica total presente nas amostras da casca (C) e massa (M) dos queijos e tábuas de maturação durante estação seca e chuvosa.....45
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos das amostras de QMACFN da região de Diamantina, MG, coletadas durante a estação seca e chuvosa.....52

ARTIGO 2

Tabela 1 - Concentrações de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1 e ocratoxina A utilizadas na construção das curvas analíticas.....70
Tabela 2 - Avaliação do efeito de matriz através de comparações entre as inclinações e interseções das curvas construídas em matriz com as curvas em solvente para cada analito.....74
Tabela 3 - Parâmetros de validação do método para cada analito em três níveis de fortificação.....75
Tabela S1 - Condições de espectrometria de massa para análise de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1 e ocratoxina A por UPLC-MS/MS.....82
Tabela S2 - Parâmetros obtidos do teste de linearidade para as curvas produzidas em solvente e em matriz.....82

ARTIGO 3

Tabela 1 - Concentrações de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e ocratoxina A utilizadas na construção das curvas analíticas.....89
Tabela 2 - Concentrações de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e ocratoxina A utilizadas na construção das curvas analíticas.....91
Table 3 - Avaliação do efeito da matriz através de comparações entre as interseções e inclinações das curvas construídas em matriz com as curvas em solvente para cada analito.....95
Tabela 4 - Parâmetros de validação dos métodos para cada analito em dois níveis de fortificação.....96
Tabela S1 - Parâmetros obtidos do teste de linearidade para as curvas produzidas em solvente e em matriz para método HPLC-FLD.....104

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE 14
1 INTRODUÇÃO 15
2 REFERENCIAL TEÓRICO 17
2.1 Aspectos Gerais do Queijo Minas Artesanal e sua Casca Florida Natural 17
2.2 A região de Diamantina como produtora do QMA 19
2.3 Diversidade fúngica em queijos artesanais 20
2.4 Fungos toxigênicos e micotoxinas em queijos artesanais 23
2.5 Métodos analíticos para determinação de micotoxinas em queijos artesanais 25
2.6 Regulamentação de micotoxinas em queijos 29
2.7 Validação de métodos analíticos 30
REFERÊNCIAS 33
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 39
ARTIGO 1 – Influência das estações do ano na micobiota e nos parâmetros físico-químicos do Queijo Minas Artesanal De Casca Florida Natural da região de Diamantina, Minas Gerais, Brasil 40
ARTIGO 2 – Validação de método multianalito baseado em "dilute in shoot" para determinação de ocratoxina A e aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) em Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural por UPLC-MS/MS 66
ARTIGO 3 – Validação de método de extração unificado para determinação de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) e ocratoxina A em Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural por ELISA e HPLC-FLD 85
CONSIDERAÇÕES FINAIS 106
APÊNDICE A – Banners entregues aos produtores de Queijo Minas Artesanal da região da Diamantina, Minas Gerais, Brasil. 107
APÊNDICE B - Cartilha disponibilizada aos produtores de Queijo Minas Artesanal. 108

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Minas Gerais se destaca como o principal estado produtor de queijos artesanais no Brasil, abrangendo diversas regiões certificadas como produtoras dos renomados Queijos Minas Artesanais (QMA). Esses queijos são amplamente reconhecidos por sua qualidade, sabor único e forte vínculo com as tradições culturais das diferentes regiões do estado, sendo seu processo de produção declarado Patrimônio Imaterial da Humanidade (UNESCO, 2024). Entre os QMA, destaca-se o Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural (QMACFN), recentemente regulamentado no estado, caracterizado pela presença predominante de fungos brancos em sua superfície, que se desenvolvem ao longo do período de maturação (MINAS GERAIS, 2024).

A microbiota exerce um papel fundamental no desenvolvimento das características sensoriais dos queijos artesanais, sendo diretamente influenciada por diferentes fatores que podem impactar a qualidade e a segurança do produto final (BIOLCATI et al., 2020). Esses fatores incluem as práticas de produção aplicadas, a interação com superfícies, período de maturação e as condições ambientais da região produtora (AVIAT et al., 2016; CARDOSO et al., 2015). Caracterizar essa microbiota é fundamental para compreender como esses diferentes fatores moldam a composição e a frequência de ocorrência dos microrganismos e sua relação com a qualidade e segurança do produto, considerando a possibilidade de contaminação por espécies indesejáveis (JONNALA et al., 2018).

O crescimento de fungos toxigênicos e a presença de micotoxinas em queijos artesanais é uma das principais preocupações dos produtores, visto a potencial contaminação desse produto com diferentes espécies de fungos micotoxigênicos ou ainda, a capacidade de algumas espécies de fungos em produzir múltiplas micotoxinas (FONTAINE et al., 2015).

Estudos destacam a importância de monitorar esses contaminantes em queijos artesanais, especialmente devido à ausência de regulamentações específicas sobre limites máximos toleráveis em produtos como o QMACFN (MARCELÃO et al., 2024; CAÑÁS et al., 2023; MARTINS, COTTER, 2023). Neste contexto, métodos analíticos confiáveis para a detecção de micotoxinas são essenciais para garantir a segurança alimentar deste produto. Técnicas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) associada à detecção por fluorescência (FLD) ou acoplada à espectrometria de massas sequencial (MS/MS) tem sido utilizada por sua precisão e capacidade de identificar diversos analitos em baixas concentrações. Paralelamente, abordagens como ensaios imunoenzimáticos (ELISA) têm sido empregadas devido à simplicidade e rapidez na análise. No entanto, a alta complexidade química das

micotoxinas e as características intrínsecas dos queijos, como o elevado teor de gordura e proteínas, representam desafios significativos para o desenvolvimento de métodos analíticos específicos e eficazes.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo investigar a influência sazonal na composição físico-química e micobiota do QMACFN, assim como no ambiente de produção, avaliando as tábuas empregadas no processo de maturação. Paralelamente, foi realizada a validação de métodos analíticos para a determinação de micotoxinas em queijos artesanais, bem como a análise da sua ocorrência em queijos artesanais de diferentes regiões produtoras, contribuindo assim para o avanço do conhecimento sobre a segurança e qualidade desse produto.

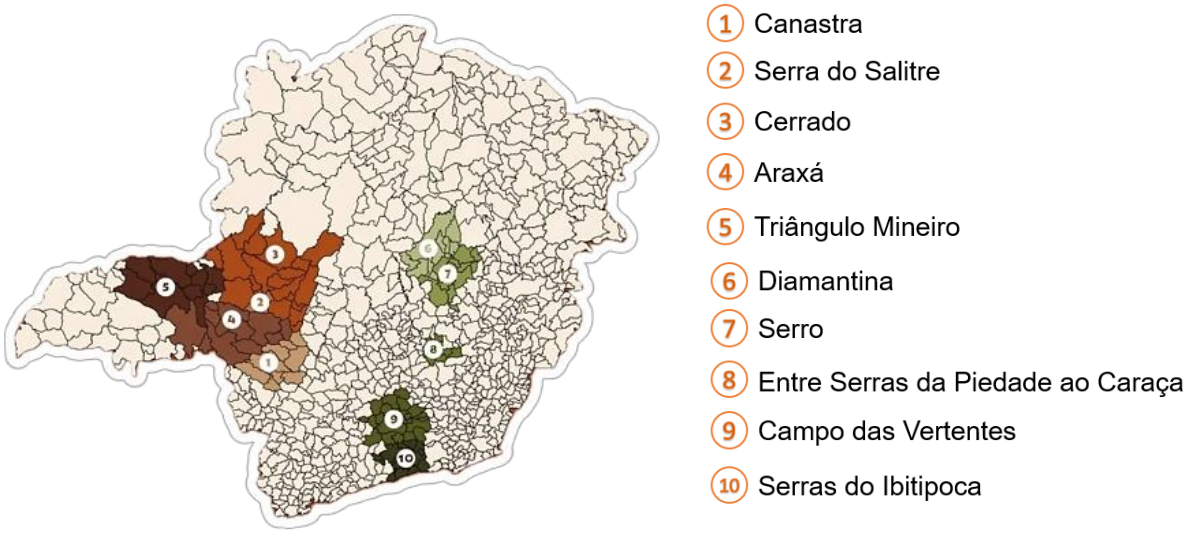
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos Gerais do Queijo Minas Artesanal e sua Casca Florida Natural

A produção de queijos no Brasil foi influenciada por práticas europeias, especialmente de países como Portugal, Espanha, França e Itália. Os imigrantes europeus trouxeram conhecimentos que moldaram um perfil único de produtos fermentados no país ao longo de quatro séculos. Inicialmente, tentou-se reproduzir os queijos do Velho Mundo na América Latina, mas fatores como clima, infraestrutura, raças leiteiras, qualidade do leite cru e microbiota local tornaram isso inviável. Assim, novas variedades foram criadas, adaptando-se às condições regionais. Os queijos artesanais brasileiros, resultado dessas adaptações, destacam-se por sua singularidade e representam a herança cultural e a identidade das diversas regiões do Brasil (PENNA; GIGANTE; TODOROV, 2021).

Minas Gerais é o estado que mais produz queijos artesanais no país e a produção do queijo a partir do leite cru é considerada uma tradição no cotidiano das fazendas deste estado (SILVA; GEOGRAFIA; 2023). Concentrado em pequenas microrregiões produtoras (Figura 1), o Queijo Minas Artesanal (QMA), é tradicionalmente produzido em pequenas propriedades rurais por todo estado (IMA, 2024).

Figura 1- Microrregiões reconhecidas como produtoras do QMA.



Fonte: Adaptado de Instituto Periférico, 2024 (INSTITUTO PERIFÉRICO, 2024).

Produzido a partir de técnicas simples e tradicionais com a utilização de basicamente leite cru de vaca, soro-fermento (pingo) e sal, o QMA, carrega consigo tradições culturais que são passadas por gerações. Sua fabricação, geralmente em contexto da agropecuária familiar, é importante tanto pela geração de renda quanto por sua conotação sociocultural (BRANT et al. 2007). Seu modo de produção tradicional apresenta grande importância cultural e histórica no contexto mineiro, sendo hoje reconhecido como Patrimônio Imaterial da Humanidade (UNESCO, 2024; SANT'ANNA et al., 2019).

Como resultado do método artesanal empregado em sua produção e maturação o QMA pode apresentar uma comunidade microbiana muito diversa, por ser produzido por leite cru e com a utilização de culturas láticas naturais, além de ter influência das características ambientais de cada região produtora e também das condições de produção de cada queijaria (KAMIMURA et al., 2019). Assim o termo microbiota *terroir* define a relação única entre a comunidade microbiana, com o clima da região de produção, o local de produção e a matéria prima para a produção do queijo (BATISTA; SANTOS; LIMA, 2023).

A interação entre diferentes microrganismos, advindos do leite, 'pingo' e ambiente, resulta em um perfil de sabor complexo, principalmente para os queijos artesanais, que pode se intensificar com a produção de compostos de sabor durante a maturação, tanto por bactérias como por fungos (ZHENG; SHI; WANG, 2021). A textura do queijo também é afetada pela ação desses microrganismos, podendo variar entre a cremosidade e a dureza, conforme for a comunidade microbiana envolvida (MCSWEENEY; SOUZA, 2000).

Por suas características sensoriais peculiares e o grande destaque em concursos nacionais e internacionais, têm-se observado um aumento no consumo de queijos artesanais no Brasil nos últimos anos, o que tem chamado atenção de estudiosos e órgãos fiscalizadores pela criação de políticas públicas que prezam o controle e garantia de uma maior qualidade e segurança deste produto. Neste sentido, recentemente a produção do Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural (QMACFN), tipo de queijo minas artesanal onde se permite o crescimento natural de fungos na superfície, foi regulamentada pela Portaria do IMA nº 2307/2024 que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do QMACFN. De acordo com a portaria é permitida a comercialização do QMACFN com presença de fungos brancos em toda a sua superfície, predominantemente de *Geotrichum candidum* (MINAS GERAIS, 2024).

Ainda segundo a portaria, a maturação, etapa em que ocorrem alterações físicas, químicas e sensoriais, necessárias para a definição da identidade do produto, deverá ser realizada em ambiente exclusivo, com temperatura controlada entre 12°C a 20ºC e umidade do

ambiente entre 80% a 90%. O período mínimo de maturação deve ser o definido por legislação para cada microrregião produtora do QMA sendo que, para regiões que não possuem período de maturação definido, será, no mínimo, de 22 dias, sendo que o período máximo não poderá ser superior a 60 dias. Após o período de maturação, o queijo deverá ser mantido refrigerado em temperatura não superior a 10°C (MINAS GERAIS, 2024).

2.2 A região de Diamantina como produtora do QMA

O município de Diamantina, no estado de Minas Gerais, está situada em meio à Serra do Espinhaço, entre as bacias dos rios São Francisco, Doce e Jequitinhonha. A região é marcada por afloramentos rochosos, cachoeiras e pelas flores sempre vivas típicas do local (EÇA et al., 2022).

A região divide dois grandes biomas, Cerrado e Mata Atlântica, e se encontra a 1296 m de altitude, seu clima é classificado como temperado úmido, com inverno seco e verão chuvoso. A precipitação média anual é de 1404 mm com temperatura média anual de 18,3°C. A estação seca abrange os meses de abril a setembro e o período chuvoso ocorre de outubro a março e representa 88% do total precipitado durante o ano (VIEIRA et al., 2010).

A formação do município de Diamantina está diretamente relacionada à exploração do ouro e dos diamantes. A ocupação do antigo Arraial do Tijuco teve início com os conflitos entre bandeirantes e povos indígenas do Vale do Jequitinhonha, intensificando-se com a descoberta de ouro no final do século XVII. No século XVIII, os diamantes se tornaram o principal motor econômico da região, alcançando a maior produção do mundo ocidental. Paralelamente, a expansão da atividade aurífera impulsionou a agropecuária e introduziu técnicas queijeiras portuguesas, com registros do consumo de queijo curado desde esse período (EÇA et al., 2022).

A cidade é um importante testemunho da ocupação do interior do País, demonstrando como no século XVIII os aventureiros à procura de riquezas e os representantes da Coroa Portuguesa adaptaram os modelos europeus a uma realidade americana, criando uma cultura original. Dessa forma, com um acervo de construções que datam do período colonial, o conjunto arquitetônico de Diamantina recebeu, em 1999, o título de Patrimônio Mundial pela Unesco (IPHAN, 2024).

Por meio da Portaria IMA nº 2.129/2022, Diamantina é definida como uma das microrregiões produtoras do QMA abrangendo os seguintes municípios: Diamantina, Gouveia, Datas, Monjolos, Couto de Magalhães de Minas, São Gonçalo do Rio Preto, Felício dos Santos, Senador Modestino Gonçalves e Presidente Kubitschek (MINAS GERAIS, 2022). As

propriedades possuem uma média de 62 cabeças de gado, sendo em média 7,5 vacas em lactação por propriedade, caracterizando produção de pequenos pecuaristas, na sua maioria de economia familiar. O rebanho da região é composto em sua maioria de animais mestiços, resultado de cruzamento de animais azebuados, como as raças Gir e Guzerá com raças europeias como Holandês, Jersey e Pardo Suíço (COSTA et al., 2022).

O queijo produzido nesta região é caracterizado por possuir forma cilíndrica, reto a arredondado, com peso de 700 a 1.000 gramas e altura de 4 a 7 centímetros ou peso de 200 a 400 gramas e altura de 4 a 6 centímetros. Possui consistência semidura, com poucas olhaduras, cor amarela com sabor levemente picante (MINAS GERAIS, 2024). Na figura 2 pode se observar QM produzido na região de Diamantina em processo de maturação.

Figura 2- QMA da região de Diamantina, MG, em processo de maturação.

Fonte: Arquivo pessoal do autor, 2024.

2.3 Diversidade fúngica em queijos artesanais

Logo após produzidos e submetidos à maturação, os QMACFN são colonizados por diversos fungos. Batista, Santos e Lima (2023) afirmam que a principal característica dos

queijos de leite cru, é que a fabricação e maturação são conduzidas por uma comunidade microbiológica complexa. Além disso, as transformações desenvolvidas na composição físico-química durante a produção levam a susceptibilidade à colonização por microrganismos ambientais durante todas as etapas de produção. Assim, os queijos artesanais são o resultado de uma interação complexa entre microrganismos indígenas, que são fundamentais no estabelecimento de características metabólicas distintas relacionadas à tipicidade e à identidade dos produtos (FERROCINO; RANTSIOU; COCOLIN, 2020).

De uma forma geral, os fungos crescem melhor em temperaturas que variam de 25 ºC a 30 °C e são mais tolerantes a condições adversas no meio, como menor disponibilidade de água e pH ácido. Fungos filamentosos necessitam de oxigênio para seu desenvolvimento, entretanto as leveduras são capazes de se desenvolver em ausência de oxigênio e altas concentrações de CO_2 (SILVA et al., 2010). Dessa forma, durante a maturação dos queijos, a microbiota da superfície e do núcleo vão se modificando e se tornando diferentes, pois esses microambientes também vão sendo alterados. O núcleo, revestido por casca, se torna anaeróbico durante a maturação, enquanto que a superfície, em contato com o ar, permanece aeróbica, conduzindo uma microbiota é diversa entre o interior e exterior dos queijos (KORENA et al., 2023).

A micobiota dos queijos representa uma fonte de vários metabólitos e enzimas, principalmente proteolíticas e lipolíticas, que representam um papel importante durante a maturação e conferem uma assinatura aromática peculiar aos produtos finais (PANTHI et al., 2017). Anelli e colaboradores (2019) afirmam que, o uso de microrganismos nativos na maturação de queijos artesanais é apreciado pelos consumidores, preservando características sensoriais típicas da região produtora.

A importância da micobiota dos queijos artesanais não se concentra apenas na geração de atributos sensoriais. Batista, Souza e Lima (2023) afirmam que os microrganismos que se desenvolvem nos queijos maturados produzidos com leite cru além de liberem compostos responsáveis pela construção de sabor e aroma, atuam como escudo biopreservativo contra populações microbianas patogênicas e deteriorantes.

Papadimitriou, Pot e Tsakalidou (2015), afirmam que fungos filamentosos indígenas têm a capacidade de se adaptar em diversos nichos alimentares e encontram o ambiente perfeito no queijo, principalmente na casca, onde desenvolveram uma estratégia de adaptação, bem como a capacidade de controlar o desenvolvimento de fungos toxigênicos como agentes de biocontrole. As leveduras, por sua vez também tem sido investigadas por seu papel bioprotetor, inibindo fungos deteriorantes e/ou micotoxigênicos além de estarem relacionadas à degradação

de toxinas (PEREIRA et al., 2015; YANG et al., 2015; SIPICZKI; HRABOVSZKI, 2023; KAWTHARANI et al., 2020).

Estudos recentes têm se dedicado à avaliação da micobiota do QMACFN como também, de queijos artesanais produzidos em diversos países. De um modo geral, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Geotrichum* spp., *Candida* spp., *Kluyveromyces* spp. e *Debaryomyces* spp. estão entre os gêneros mais comumente identificados.

A comunidade fúngica em queijos artesanais produzidos da microrregião da Canastra foi avaliada por Aragão et al. (2022). A pesquisa identificou a predominância de fungos filamentosos e leveduras, incluindo, *G. candidum*, *Paecilomyces* spp., *Fusarium* spp., *Trichosporon coremiiforme*, *Diutina catenulata*, *Aspergillus* spp., *Kluyveromyces* spp., *Torulaspora* spp. e *Debaryomyces* spp. Na avaliação da microbiota presente nas amostras do QMACFN da região do Serro, Souza et al. (2021) observaram a presença de fungos como *Debaryomyces hansenii*, G. *candidum*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides* e *Kluyveromyces lactis*, *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp.

Penland e colaboradores (2021), em estudo sobre correlação entre a microbiota autóctone do queijo Pélardon, um queijo artesanal de leite de cabra, produzido no sul da França, e os principais produtos de fermentação e compostos aromáticos, observaram que entre as espécies dominantes estavam *G. candidum*, *D. hansenii*, *K. lactis*, *Penicilium glabrum*, *Penicillium commune* e *Scopulariopsis brevicaulis*. Os resultados revelaram a importância da dinâmica da comunidade desde o início do processo de fabricação de queijos para a produção das características sensoriais próprias do queijo.

A micobiota presente no queijo Robiola di Roccaverano, um queijo artesanal produzido na Itália foi avaliada por Biocalti et al. (2020). Entre as espécies identificadas estavam *G. candidum*, *K. lactis*, *Y. lipolytica* e *Candida pararugosa*.

Como relatado, a micobiota avaliada nos queijos artesanais brasileiros, apresenta similaridades com a micobiota de queijos tradicionais de outros países, como França e Itália. Ao comparar a composição da comunidade microbiana de queijos artesanais fabricados na Europa e nos Estados Unidos, Wolfe e colaboradores (2014) afirmam que, apesar da suposição de que queijos feitos e maturados nas mesmas regiões geográficas teriam composição microbiana mais similar do que aqueles fabricados em locais mais distantes, a composição da comunidade não está significativamente correlacionada com a distância geográfica. Sugerindo que outros fatores, como condições ambientais e práticas de fabricação, podem ter um papel mais determinante na composição microbiana dos queijos.

2.4 Fungos toxigênicos e micotoxinas em queijos artesanais

O crescimento de fungos em queijos artesanais pode ser considerado sob duas perspectivas, ou seja, enquanto o desenvolvimento de alguns fungos desejáveis é essencial na determinação das características sensoriais e segurança de muitas variedades de queijo, alguns fungos podem representar risco devido à produção de micotoxinas, com consequências potencialmente sérias para a saúde além de causarem perdas econômicas associadas à deterioração (MARTIN et al., 2023).

De fato, fungos toxigênicos são capazes de crescer em uma ampla gama de substratos, incluindo rações, cereais, grãos e também, queijos, em qualquer estágio da produção, durante o armazenamento e sob diferentes condições climáticas (HYMERY et al., 2014). Dessa forma, o crescimento de fungos indesejáveis e a presença de micotoxinas nos queijos é uma das principais preocupações dos produtores, visto a potencial contaminação desse produto com diferentes espécies de fungos micotoxigênicos ou ainda, a capacidade de algumas espécies de fungos em produzir múltiplas micotoxinas (FONTAINE et al., 2015).

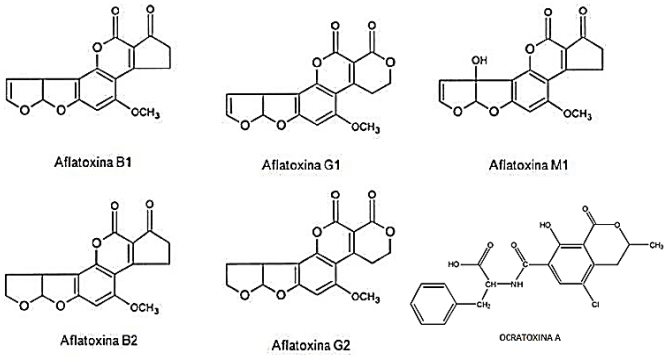
Diversos gêneros fúngicos estão associados a problemas em diferentes tipos de queijos, incluindo *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Dentre esses, espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são as principais preocupações, pois, além de causarem defeitos que comprometem a qualidade do produto, também podem produzir micotoxinas em queijos artesanais (KURE; SKAAR, 2019).

Alguns trabalhos tem relatado a presença de fungos toxigênicos como também de micotoxinas em queijos artesanais de diferentes países. No Brasil, *Aspergillus flavus* potencial produtor de aflatoxinas B1 e B2 foi detectado no QMACFN da microrregião da Serro (SOUZA et al., 2021). Marcelão et al. (2024) ao avaliarem queijos artesanais produzidos no estado de Minas Gerais e São Paulo, relataram a presença de espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* e detecção de ocratoxina A (OTA) em 22% das amostras. A presença de OTA em queijos Brie, Camembert e Azul produzidos na Espanha foi reportada por Cañás et al. (2023) em níveis variando de 4,8 μg/kg à 9,6 μg/kg.

As micotoxinas são um grupo de metabólitos secundários produzidos por vários fungos filamentosos, ou seja, não têm papel no metabolismo e crescimento desses microrganismos. São potencialmente tóxicas tanto para o homem quanto para os animais devido ao potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico. E, embora sejam prejudiciais, não induzem resposta imunológica imediata (SUN et al., 2023; HYMERY et al., 2014).

No queijo, as micotoxinas mais perigosas são ocratoxina A e aflatoxina M1. Elas são, respectivamente, produzidas por espécies fúngicas indesejadas, seja por contaminação direta do queijo ou contaminação indireta do leite usado para a fabricação de queijo devido ao consumo de ração contaminada com aflatoxina B1 pelos animais. Esta é metabolizada em M1 no organismo do animal e depois excretada no leite (HYMERY et al., 2014). A presença de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, apesar de menos incidênte, também já foi reportada em queijos e outros lácteos (KILICEL et al., 2017; SAKIN et al., 2018). Na figura 2 podem ser observadas as estruturas químicas das principais aflatoxinas e da ocratoxina A.

Figura 3 – Estrutura química das principais aflatoxinas e da ocratoxina A.



Fonte: Adaptado de Souto et al. (2017).

O grupo das aflatoxinas é um dos mais importantes devido a sua ampla distribuição em diversos tipos de alimentos e alto grau de toxicidade. Estão descritos 18 tipos de aflatoxinas. As aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 são produzidas naturalmente por espécies de *Aspergillus*, principalmente por *A. flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, sendo classificadas no "Grupo I" pela IARC (International Agency for Research on Cancer) como compostos altamente carcinogênicos para os seres humanos (KUMAR et al., 2017; IARC, 2024).

A aflatoxina B1 é reconhecida como a micotoxina mais tóxica dentro deste grupo, geralmente presente, principalmente, em cereais e ração animal. Após ser ingerida pelo animal, aflatoxina B1 passa pelo processo de biotransformação primária no fígado. Neste processo ocorre a hidroxilação da molécula, resultando na formação de metabólitos tóxicos, tal como a aflatoxina M1 (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A aflatoxicose, causada pela ingestão de aflatoxinas, pode ser aguda ou crônica. Na forma aguda, provoca danos ao fígado, rins e coração, com sintomas como icterícia, vômitos, dor abdominal e insuficiência hepática, podendo ser fatal. Já a exposição crônica está ligada à desnutrição, imunossupressão e aumento do risco de câncer, especialmente em portadores de

hepatite B, que apresentam até 60 vezes mais chances de desenvolver câncer de fígado devido à alta toxicidade da aflatoxina B1 (SCHNEIDER; MOSTARDEIRO, 2007).

A ocratoxina A é produzida por cepas do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Considerando o gênero *Aspergillus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergllus westerdijkiae*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* são os principais responsáveis pela ocorrência de ocratoxina A em produtos alimentícios juntamente com duas espécies de *Penicillium*, *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum* (TJAMOS; ANTONIOU; TJAMOS, 2006).

Após ser ingerida, a ocratoxina A é absorvida no trato gastrointestinal, ligando-se a proteínas plasmáticas, como a albumina, e distribuindo-se pelo organismo, com maior concentração nos rins e menores níveis no fígado, músculos e tecido adiposo. Está relacionada a diversos efeitos toxicológicos, incluindo nefrotoxicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, neurotoxicidade e imunotoxicidade, em animais e seres humanos. A IARC classificou a substância no “Grupo 2B”, indicando que é possivelmente carcinogênica para humanos (WIĘCKOWSKA, et al., 2024).

A produção e a estabilidade de micotoxinas em queijos dependem de diversos fatores bióticos e abióticos, sendo que, a presença de fungos toxigênicos no produto não resulta, necessariamente, na formação dessas toxinas. Da mesma forma que, a ausência de fungos visíveis não asseguram a inexistência de toxinas, pois o fungo pode não estar mais viável, deixando as toxinas preservadas no produto (TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009). 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 (Aw) 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 (HYMERY et al., 2014; MARTIN; COTTER, 2023).

2.5 Métodos analíticos para determinação de micotoxinas em queijos artesanais

As micotoxinas e os distúrbios de saúde associados em humanos e animais são reconhecidos como um grande problema de saúde e econômico. A toxicidade desses compostos levou muitos países a estabelecer regulamentações para seu controle em alimentos e rações e o consequente estabelecimento de legislação para controlar sua possível contaminação (SILVA et al., 2011).

Dessa forma, houve um crescente avanço no desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de micotoxinas em diferentes matrizes. As técnicas incluem métodos diretos que se baseiam nas características físicas e químicas das toxinas, e métodos indiretos, como imunoensaios (ELISA), que detectam as toxinas por interação com anticorpos (TITTLEMIER et al., 2023).

A análise de micotoxinas em alimentos e rações é geralmente um processo de várias etapas, a citar, preparo da amostra, extração da toxina da matriz, limpeza do extrato e, finalmente, detecção e determinação quantitativa (KÖPPEN et al., 2010). A seleção do método de extração deve considerar a micotoxina em análise, a matriz alimentar envolvida e os equipamentos disponíveis. O método escolhido precisa ser eficaz na identificação do analito, garantindo a precisão e a sensibilidade necessárias. Além disso, a extração deve proporcionar altas taxas de recuperação de todas as micotoxinas presentes na matriz específica (ROMERO-GONZALEZ et al., 2011).

Durante o processo de extração, o analito e outros compostos com propriedades semelhantes são transferidos para o solvente extrator até que seja alcançado o equilíbrio. Assim, os compostos de interesse podem ser concentrados no solvente, enquanto os interferentes são eliminados. Devido à ausência de um solvente completamente específico, os solventes escolhidos são os que podem remover o máximo de micotoxinas quanto possível, com um mínimo de interferentes (RAHMANI et al., 2009).

A maioria das micotoxinas é solúvel em solventes polares e ligeiramente polares, e insolúvel em solventes apolares (TURNER et al., 2009). Assim, uma ampla variedade de solventes, isolados ou em combinações, tem sido utilizada nos métodos de extração de micotoxinas em alimentos e rações, entre eles, acetona, acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e metanol. À depender da matriz com altos teores de gorduras, como amendoim e queijo, solventes não polares, como hexano, são usados para remover componentes lipofílicos (KÖPPEN et al., 2010).

As características intrínsecas dos queijos, como o alto teor de gordura e proteínas, juntamente com a complexidade química das micotoxinas que podem ser encontradas nesses produtos, representam um desafio significativo para o desenvolvimento de métodos analíticos. Consequentemente, há uma disponibilidade limitada de técnicas específicas para a extração e quantificação de micotoxinas em queijos (CAÑÁS et al., 2023).

A eficiência de soluções extratoras baseados em acetonitrila em comparação com metanol tem sido demonstrada por vários pesquisadores (HUANG et al., 2014; BELTRÁN et al., 2009; GONZÁLEZ-JARTÍN et al., 2018; NAKHJAVAN et al., 2020). Sua capacidade de

dissolver analitos de diferentes polaridades, reduzir a presença de coextrativos lipofílicos da amostra e precipitar proteínas, tem tornado seu uso frequente em métodos de extração. Esses benefícios são particularmente importantes em análises de produtos lácteos, proporcionando extratos mais puros e com menor quantidade de interferentes (ABREU et al., 2020; MATEUS et al., 2021; MUSLIU et al., 2022; WHANG et al., 2011).

Soluções extratoras compostas por misturas de diclorometano e acetato de etila também têm se mostrado altamente eficientes na extração de micotoxinas de diferentes polaridades. O diclorometano contribui para a redução de interferentes lipofílicos, enquanto o acetato de etila, com maior polaridade, permite a extração de toxinas polares (GOMPA, 2013; AGRIOPOULOU et al., 2020). Delmulle et al. (2006) observaram que essa combinação proporcionou melhores taxas de recuperação para 16 micotoxinas comparado ao uso de metanol e água. Os autores destacaram que a diferença de polaridade entre os solventes foi crucial, principalmente para a ocratoxina A, que por ser menos polar que outros analitos, como aflatoxinas e deoxinivalenol, beneficiou-se dessa combinação de solventes. O acetato de etila, mais polar, e o diclorometano, com menor polaridade, juntos, melhoraram a eficiência da extração de uma gama mais ampla de micotoxinas.

Na etapa de extração, a presença de coextrativos pode causar grandes problemas, mais importante, o mascaramento do sinal analítico para o analito alvo e o consequente aumento do limite de detecção. A purificação do extrato sido utilizada com o objetivo de aumentar a seletividade na análise de micotoxinas contribuindo significativamente para a remoção de interferentes presentes na matriz. Técnicas como extração em fase sólida (SPE) e colunas de imunoafinidade (IAC) são amplamente reconhecidas e aplicadas para essa finalidade, sendo métodos oficiais pela AOAC. As SPE utilizam adsorventes para remover interferentes, enquanto as IAC empregam anticorpos específicos para capturar e separar as micotoxinas de interesse, tornando o processo altamente seletivo (KÖPPEN et al., 2010; ABREU et al., 2020).

Embora as etapas de purificação sejam altamente eficazes para melhorar a seletividade e reduzir interferentes, sua implementação requer materiais especializados e, em alguns casos, insumos de alto custo, como cartuchos ou colunas imunoespecíficas. Neste contexto, diferentes métodos têm sido desenvolvidos com o objetivo de simplificar o processo analítico, reduzindo a necessidade de etapas complexas e dispendiosas. A técnica *dilute and shoot* (diluir e injetar) apresenta baixo consumo de solventes, simplicidade, rapidez e apreciável taxas de recuperação, além de obter análises cromatográficas livres ou com menor efeito matriz (ABREU et al., 2020). A abordagem *dilute and shoot* consiste na diluição e injeção do extrato bruto, sem qualquer limpeza.

No entanto, a aplicação dessas técnicas de extração, sem etapa de *clean up*, em amostras complexas, muitas vezes, apresenta um desafio devido aos altos níveis de co-extrativos que podem afetar negativamente, não apenas a extração e a eficiência cromatográfica, mas também a instrumentação (CHAMKASEM et al., 2013).

As características intrínsecas dos queijos, como o elevado teor de gorduras e proteínas, aliadas à complexidade química das micotoxinas potencialmente presentes nesses produtos, representam desafios consideráveis no desenvolvimento de métodos analíticos. Nesse contexto, torna-se crucial o desenvolvimento de métodos eficazes de preparo de amostras que minimizem a presença de coextrativos da matriz, garantindo uma extração eficiente e precisa (CAÑÁS et al., 2023).

Em relação à detecção e quantificação das micotoxinas, geralmente são utilizadas técnicas cromatográficas em combinação com uma variedade de detectores ou por métodos imunoenzimáticos. Atualmente técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por espectrometria de massa única (MS) ou espectrometria de massa sequencial (MS/MS) ou fluorescência (FLD) são as mais comumente usadas em análises quantitativas de micotoxinas, enquanto a triagem de amostras é frequentemente realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) (TURNER et al., 2006; TITTLEMIER et al., 2023).

Recentemente, Marcelão et al. (2024) aplicaram método baseado em HPLC-FLC para detecção de ocratoxina A em diferentes queijos artesanais brasileiros. A purificação do extrato foi promovida pela utilização de coluna de imunoafinidade. Ao avaliar a presença de aflatoxina M1 durante a produção do queijo Grana Padano Grana, típico da região da Itália, Manetta et al. (2009) utilizaram técnica de extração baseada em SPE e posterior quantificação por HPLC-FLD.

Os métodos baseados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizam a interação antígeno-anticorpo, com a detecção realizada por substratos cromogênicos que geram uma reação colorimétrica, posteriormente medida por espectrofotometria. Embora sejam métodos eficientes, sua precisão pode ser comprometida por fatores como reatividade cruzada e efeitos de matriz, os quais podem levar a resultados falso-positivos ou falso-negativos, impactando a confiabilidade da análise (KÖPPEN et al., 2010).

Para minimizar esses problemas, muitos kits de teste especificam as matrizes adequadas para uso, para as quais foram previamente validadas. No entanto, a maioria dos kits disponíveis comercialmente é desenvolvida principalmente para matrizes como cereais, grãos, nozes e castanhas, devido à alta relevância dessas categorias de alimentos na contaminação por micotoxinas (ZHENG et al., 2005). Essas restrições podem limitar sua aplicação em outras

matrizes, como queijos, exigindo adaptações nos protocolos para ampliar sua utilização. Dessa forma, a disponibilidade de kits comerciais para a avaliação de diferentes micotoxinas em queijos é limitada, estando disponíveis alguns kits para micotoxinas específicas, como aflatoxina M1 ou em outros casos, kits que requerem adaptação para serem aplicados em produtos lácteos, como queijos.

A substituição de procedimentos clássicos por técnicas analíticas modernas, como a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS), tem revolucionado a análise de micotoxinas. Essas abordagens permitem o desenvolvimento de métodos multimicotoxinas para análise simultânea de compostos pertencentes a diferentes famílias químicas. Um exemplo dessa aplicação foi apresentada por González-Jartín et al. (2021) durante a avaliação de 40 micotoxinas, regulamentadas e emergentes, em leite de vaca cru, quantificadas com sucesso por UPLC-MS/MS. Cañás et al. (2023), avaliaram a presença simultânea de 32 micotoxinas em queijos tipo emental, azul, brie e camembert produzidos na Espanha, utilizando UPLC-MS/MS. O estudo demonstrou que o método possui alta eficiência analítica, sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar múltiplas toxinas em uma única corrida analítica.

2.6 Regulamentação de micotoxinas em queijos

A nível mundial, o controle da presença de micotoxinas em alimentos e rações é regulamentado por diretrizes como as do Codex Alimentarius, ou legislações específicas, como a União Européia e o Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos existem (MAZIERO et al., 2010). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a responsável por estabelecer limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Essas regulamentações refletem uma preocupação crescente com a segurança alimentar, mas ainda carecem de parâmetros específicos para algumas matrizes alimentares, como os queijos artesanais.

Atualmente, os queijos artesanais não possuem limites regulamentados específicos para a presença de micotoxinas, sendo que os limites estabelecidos se restringem apenas à aflatoxina M1, em leite cru e derivados lácteos de uma forma geral. Na União Europeia, por exemplo, não há limites estabelecidos para a aflatoxina M1 em queijos, mas apenas para leite cru, com um limite de 0,05 μg/kg para produtos destinados à fabricação de derivados (CE, 2023). De forma semelhante, no Brasil, a legislação vigente estabelece limites apenas para aflatoxina M1 no leite e em queijos de forma geral, sem distinções específicas para os artesanais (BRASIL, 2022). A

Comissão do Codex Alimentarius estabeleceu um limite máximo de 0,50 μg/kg para aflatoxina M1 no leite e produtos lácteos (CODEX, 2019).

No entanto, a relevância da presença de micotoxinas em queijos maturados, especialmente ocratoxina A, tem sido objeto de preocupação. Em 2020, a Comissão Europeia solicitou à Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) a atualização de seu parecer técnico de 2006 sobre a presença de ocratoxina A em alimentos, dado o impacto significativo que queijos maturados podem ter na exposição alimentar a essa toxina (EFSA, 2020).

Dado o potencial de presença de fungos toxigênicos e micotoxinas em queijos, especialmente em produtos artesanais onde as condições de produção e maturação podem favorecer a contaminação, torna-se evidente a necessidade de estabelecer regulamentações específicas. A implementação de limites máximos permitidos para diferentes micotoxinas em queijos, aliada ao monitoramento efetivo através de técnicas analíticas eficientes, poderia minimizar os riscos à saúde pública, promovendo padrões mais seguros para esses alimentos.

2.7 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é essencial para assegurar sua precisão na quantificação de compostos. Para tanto, é necessário realizar uma série de verificações, com o objetivo de obter resultados confiáveis e que atendam aos critérios estabelecidos pelas agências reguladoras (ABREU, 2019).

No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), através da DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020) é o órgão credenciado para avaliar a competência dos ensaios analíticos. Em escala mundial, a União Europeia tem os mais extensos regulamentos para micotoxinas em alimentos e rações (EC, 2023), aplicando-se a mercados europeus internos, bem como a importações (KÖPPEN et al., 2010). Além desses regulamentos, para ensaios por espectrometria de massas são apresentados níveis de desempenho mínimo pela Diretiva 2002/657 (EC, 2002), sugerindo as avaliações necessárias para identificação e quantificação das espécies em estudo.

Parâmetro de desempenho é definido pela EC (2002) como uma qualidade funcional que pode ser atribuída a um método de ensaio. Os parâmetros de desempenho típicos em uma validação intralaboratorial de métodos de ensaio quantitativos incluem linearidade da curva de calibração, efeitos de matriz, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação.

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras em uma dada faixa de concentração. A faixa de trabalho compreende as concentrações em que a linearidade for atingida, definindose, assim, a curva de calibração correspondente. Para avaliação da linearidade, inicialmente deve ser definida a faixa de trabalho. Esta faixa já pode estar definida pelo próprio método normalizado ou pode ser definida pelo analista, com base na faixa de concentração do analito que se espera encontrar ou avaliar (BRASIL, 2015).

A linearidade pode ser verificada pela equação da regressão linear e a qualidade do ajuste deve ser verificada empregando a ferramenta estatística mais adequada. As curvas analíticas também podem ser empregadas para estimar os limites de detecção e quantificação (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; BRASIL, 2015).

Seletividade é o grau em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2020).

Estudos dos efeitos de matriz correspondem um tipo específico de estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz amostral. O critério adotado para determinação do efeito matriz é a comparação entre as curvas relativas ao analito em solvente e na amostra fortificada com o analito (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002).

A exatidão é o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A determinação da exatidão deve ser feita por intermédio de ensaios de recuperação do método, obtida pela razão entre a média de valores medidos e um valor de referência (INMETRO, 2020).

Precisão é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições pré-estabelecidas. O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio. Uma menor precisão é indicada através de um elevado desvio padrão (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002). Em casos de validação intralaboratorial, as duas condições mais comuns para obtenção da precisão são repetibilidade, e precisão intermediária (INMETRO, 2020). A repetibilidade avalia a variabilidade encontrada quando resultados independentes são

obtidos utilizando o mesmo método, em um mesmo laboratório, com o mesmo analista, usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando condições como diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002).

Limite de detecção (LD) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio. Já o limite de quantificação (LQ) é expresso como a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Estratégias diferentes podem ser utilizadas para a estimativa de LD e LQ, como o cálculo da variabilidade de sinais em branco ou a partir da curva analítica. A seleção do procedimento para estimativa desses limites depende principalmente de requisitos legais, bem como disponibilidade de amostras em branco ou a praticidade de experimentos de calibração (INMETRO, 2020).

REFERÊNCIAS

ABREU, D. C. P. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de multimicotoxinas em amostras de amêndoas de cacau por LC-MS/MS**. 2019. Tese (Doutorado em Química/Bioquímica) – Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

ABREU, D. C. P.; DA SILVA OLIVEIRA, F. A.; VARGAS, E. A.; MADUREIRA, F. D.; MAGALHÃES, E. J.; DA SILVA, L. P.; SACZK, A. A. Methodology development based on "dilute and shoot" and QuEChERS for determination of multiple mycotoxins in cocoa by LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 8, p. 1757-1767, Mar. 2020. DOI: 10.1007/s00216-020-02390-5.

AGRIOPOULOU, S.; STAMATELOPOULOU, E.; VARZAKAS, T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: prevention and detoxification in foods. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 137, 2020. DOI: 10.3390/foods9020137.

ANELLI, P. *et al.* Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. **Food Microbiology**, v. 78, p. 62-72, 2019. DOI: 10.1016/j.fm.2018.09.014.

MANETTA, A. C.; GIAMMARCO, M.; DI GIUSEPPE, L.; FUSARO, I.; GRAMENZI, A.; FORMIGONI, A.; VIGNOLA, G.; LAMBERTINI, L. Distribution of aflatoxin M1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 595-599, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.085.

ARAGÃO, M. et al. Fungal community and physicochemical profiles of ripened cheeses from the Canastra of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 12, p. 4685–4694, 2022. DOI: 10.1007/s13197-022-05548-4.

BATISTA, L. R.; SANTOS, M. A. A.; LIMA, F. R. Queijo Minas Artesanal de Casca Florida: microbiota terroir de superfície. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 44, p. 62-69, 2023.

BELTRÁN, E.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 12, p. 1801-1809, 2009. DOI: 10.1002/rcm.4077.

BIOCALTI, M. et al. Microbial characterization of an artisanal production of Robiola di Roccaverano cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, 2020.

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**, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos**. Brasília: MAPA, 2015. 51 p.

CAÑÁS, R. I. et al. Detection of mycotoxins in cheese using an optimized analytical method based on a QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS quantification. **Food Chemistry**, v. 408, p. 135182, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.135182.

CHAMKASEM, N. et al. Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 2315-2329, 2013. DOI: 10.1021/jf304191c.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed** (CXS 193-1995). Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 2019. Disponível em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193e.pdf. Acesso em: 12 dez. 2024.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Regulamento n.º 401/2006. **Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs**. Official Journal of the European Communities, v. L70, p. 12–34, 2006. Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R0401&from=EN. Acesso em: 10 dez. 2024.

DELMULLE, B.; DE SAEGER, S.; ADAMS, A.; DE KIMPE, N.; VAN PETEGHEM, C. Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins on cellulose filters and in fungal cultures. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 5, p. 771–776, 2006. DOI: 10.1002/rcm.2373.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results**. 2002/657/EC. Official Journal of the European Communities, 2002. Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=EN. Acesso em: 10 dez. 2024.

EÇA, R. G. M. et al. Queijo Minas Artesanal Gosto e Território. **Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial** (SENAC). Belo Horizonte: Senac Minas, 2022.

EFSA. **Risk assessment of ochratoxin A in food**. The EFSA Journal, v. 18, n. 5, p. 6113, 2020. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.6113. Disponível em: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113. Acesso em: 15 dez. 2024.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Regulation (EC) No 915/2023 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006** (Text with EEA relevance) C/2023/35. Official Journal of the European Union, L 119, p. 103–157, 5 May 2023. Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj/eng. Acesso em: 15 dez. 2024.

FERROCINO, I.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Investigating dairy microbiome: an opportunity to ensure quality, safety and typicity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 73, p. 164–170, 2022. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.11.004.

FONTAINE, K. et al. Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined cheeses. **Food Control**, v. 47, p. 634–640, 2015. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.07.029.

GOMPA, L. **Ochratoxin A: Evaluation of methodologies for determination of ochratoxin A in food commodities, contamination levels in different products available in the US market and evaluation of fungal microbiota associated with some of the products**. 147 p. Thesis (Master of Science) – University of Nebraska, 2013. Disponível em: https://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/1/. Acesso em: 5 dez. 2024.

GONZÁLEZ-JARTÍN, J. M. et al. A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer. **Food Chemistry**, v. 275, p. 703-710, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.09.162.

HUANG, L. C. et al. Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α-zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 146, p. 242-249, 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.047.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, Amsterdam, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

HYMERY, N. et al. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 13, n. 4, p. 437-456, 2014.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Agents classified by the IARC Monographs**, v. 1–137. Disponível em: https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications. Acesso em: 15 dez. 2024.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Queijos Artesanais**. Disponível em: https://www.ima.mg.gov.br/agroindustria/queijos-artesanais. Acesso em: 16 dez. 2024.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação de métodos de ensaios químicos** DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2020. 30 p. Rev. 09.

INSTITUTO PERIFÉRICO. **Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: https://www.institutoperiferico.org/queijominaspatrimonio. Acesso em: 16 dez. 2024.

IPHAN - INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL. **O centro histórico de Diamantina (MG)**. Disponível em: http://portal.iphan.gov.br/pagina/detalhes/32. Acesso em: 14 dez. 2024.

KAMIMURA, B. A. et al. Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636-1657, 2019. DOI: 10.1111/1541-4337.12478.

KAWTHARANI, H. et al. Impact of the inoculation method of *Geotrichum candidum*, used as biocontrol agent, on T-2 toxin produced by *Fusarium sporotrichioides* and *F. langsethiae* during the malting process. **Toxins** (Basel), v. 14, n. 4, p. 239, 2022. DOI: 10.3390/toxins14040239.

KÖPPEN, R. et al. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1595-1612, 2010. DOI: 10.1007/s00253-010-2535-1. 26 mar. 2010.

KORENA, K. et al. Microbial succession in the cheese ripening process - competition of the starter cultures and the microbiota of the cheese plant environment. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1735, 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11071735.

KUMAR, P. et al. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. **Frontiers in Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 2170, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02170.

KURE, C. F.; SKAAR, I. The fungal problem in the cheese industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 29, p. 14-19, 2019. DOI: 10.1016/j.cofs.2019.02.006.

MARCELÃO, C. V. P. et al. Unveiling ochratoxin A and ochratoxigenic fungi in Brazilian artisanal cheeses: insights from production to consumption. **Food Research International**, v. 183, p. 114214, 2024. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.114214.

MARTIN, J. G. P.; COTTER, P. D. Filamentous fungi in artisanal cheeses: A problem to be avoided or a market opportunity? **Heliyon**, v. 9, n. 4, p. e15110, 2023. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e15110.

MARTIN, J. G. P. et al. Seasonal variation in the Canastra cheese mycobiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 5437, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1064824.

MATEUS, A. R. S. et al. Development and validation of QuEChERS followed by UHPLC-ToF-MS method for determination of multi-mycotoxins in pistachio nuts. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5754, 2021. DOI: 10.3390/molecules26195754.

MCSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. **Lait**, v. 80, n. 3, p. 293-324, 2000. DOI: 10.1051/lait:2000117.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 2.129, de 22 de março de 2022. **Identifica a Região de Diamantina como produtora de Queijo Minas Artesanal**. Belo Horizonte: IMA, 2022.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 2303, de 20 de maio de 2024. **Estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Artesanal.** Belo Horizonte: IMA, 2024.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 2307, de 12 de junho de 2024. **Estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural**. Belo Horizonte: IMA, 2024

MUSLIU, H. Z. et al. Determination of veterinary drug residues, mycotoxins, and pesticide residues in bovine milk by liquid chromatography electrospray ionisation - tandem mass spectrometry. **Journal of Veterinary Research**., v. 66, n. 2, p. 215-224, 2022. DOI: 10.2478/jvetres-2022-0027.

NAKHJAVAN, B.; AHMED, N. S.; KHOSRAVIFARD, M. Development of an improved method of sample extraction and quantitation of multi-mycotoxin in feed by LC-MS/MS. **Toxins** (Basel), v. 12, n. 7, p. 462, 2020. DOI: 10.3390/toxins12070462.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 168-180, 2009. DOI: 10.1016/j.aca.2008.11.010.

PANTHI, R. R. et al. Selection and treatment of milk for cheesemaking. In: McSWEENEY, Paul L. H.; FOX, Patrick F.; COTTER, Paul D.; EVERETT, David W. (Org.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 4. ed. London: Academic Press, 2017. p. 1-22.

PAPADIMITRIOU, K.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. How microbes adapt to a diversity of food niches. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 29-35, 2015. DOI: 10.1016/j.cofs.2015.01.001.

PENLAND, M. et al. Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 345, p. 109-118, 2021. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109118.

PENNA, A. L. B.; GIGANTE, M. L.; TODOROV, S. D. Artisanal Brazilian cheeses—history, marketing, technological and microbiological aspects. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1562, 2021. DOI: 10.3390/foods10071562.

PEREIRA, G. et al. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus Aspergillus westerdijkiae on coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 96-101, 2016. DOI: 10.1111/lam.12520.

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 3, p. 201-251, 2009. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00079.x.

ROMERO-GONZÁLEZ, R. et al. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 47, p. 8614-8625, 2011. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.029

SAKIN, F.; TEKELI, İ. O.; YIPEL, M.; KÜREKCI, C. Occurrence and health risk assessment of aflatoxins and ochratoxin A in Sürk, a Turkish dairy food, as studied by HPLC. **Food Control**, v. 90, p. 317-323, 2018. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.03.012.

SANT'ANNA, F. M. et al. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**, v. 82, p. 349-362, 2019.

SCHNEIDER, E. M.; MOSTARDEIRO, C. P. Aflatoxinas em amendoim e toxicidade no organismo humano. **Revista Contexto e Saúde**, v. 7, n. 13, p. 1-11, 2007.

SILVA, D. D. et al. Micotoxinas em cadeias produtivas do milho: riscos à saúde animal e humana. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 27 p.

SILVA, K. T.; MACHADO, P. J. O. Aspectos geográficos, culturais e socioeconômicos do queijo minas artesanal das Serras da Ibitipoca, MG. **Revista de Geografia**, v. 1, n. 2, p. 1-15, 2023. ISSN: 2236-837X.

SILVA, M. C. D. et al. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 214-221, 2010.

SIPICZKI, M.; HRABOVSZKI, V. *Galactomyces candidus* diversity in the complex mycobiota of cow-milk bryndza cheese comprising antagonistic and sensitive strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 388, p. 110088, 2023. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110088.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005. DOI: 10.1016/j.aca.2005.07.043.

SOUZA, T. P. et al. Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. **International Dairy Journal**, v. 120, p. 105085, 2021.

SUN, Y. et al. Immunotoxicity of Three Environmental Mycotoxins and Their Risks of Increasing Pathogen Infections. **Toxins**, v. 15, n. 3, p. 187, 2023. DOI: 10.3390/toxins15030187.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TITTLEMIER, S. A. et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2021-22. **World Mycotoxin Journal**, v. 16, n. 1, p. 3-24, 2023. DOI: 10.3920/WMJ2022.2822.

TJAMOS, S. E.; ANTONIOU, P. P.; TJAMOS, E. C. Aspergillus spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 61-66, 2006.

UNESCO. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA. **Traditional ways of making Artisan Minas Cheese in Minas Gerais**. Disponível em: https://ich.unesco.org/en/RL/traditional-ways-of-making-artisan-minas-cheese-in-minas-gerais-02102. Acesso em: 14 dez. 2024.

VIEIRA, J. P. G. et al. Estudo da precipitação mensal durante a estação chuvosa em Diamantina, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 7, p. 762-767, 2010.

WANG, H. et al. Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M1 residues in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3532-3538, 2011. DOI: 10.1021/jf2006062.

WIĘCKOWSKA, M. et al. Ochratoxina A e seu papel no desenvolvimento do câncer: uma revisão abrangente. **Cancers**, v. 16, n. 20, p. 3473, 2024. DOI: 10.3390/cancers16203473.

WOLFE, B. E. et al. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 422–433, 2014.

YANG, Q. et al. Ochratoxin A is degraded by *Yarrowia lipolytica* and generates non-toxic degradation products. World Mycotoxin Journal, v. 9, n. 2, p. 269-278, 2016.

ZHENG, X.; SHI, X.; WANG, B. A Review on the General Cheese Processing Technology, Flavor Biochemical Pathways and the Influence of Yeasts in Cheese. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 703284, 2021.

ZHENG, Z. et al. Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. **Mycopathologia**, v. 159, n. 2, p. 265-272, 2005. DOI: 10.1007/s11046-004-8663-3.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 – Influência das estações do ano na micobiota e nos parâmetros físico-químicos do Queijo Minas Artesanal De Casca Florida Natural da região de Diamantina, Minas Gerais, Brasil

Formatado de acordo com as diretrizes do Journal of Food Science
ISSN: 1750-3841
(versão preliminar)

Fabiana Regina Lima fabianalima1818@hotmail.com

Fabiana Franca Reinis Passamani fabireinis@gmail.com

Elisângela Jaqueline Magalhães jaqueline.magalhaes@ufla.br

Kelly Aparecida da Cunha Pereira kelly.pereira5@estudante.ufla.br

Luiz Ronaldo de Abreu luizronaldo@ufla.br

Jaqueline de Paula Rezende jaquelinerezende@ufla.br

Luís Roberto Batista luisrb@ufla.br

Afiliações dos autores

Os autores Fabiana Regina Lima, Fabiana Franca Reinis Passamani, Kelly Aparecida da Cunha Pereira, Luiz Ronaldo de Abreu, Jaqueline de Paula Rezende, Luís Roberto Batista estão lotados no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos. Caixa Postal 3037 - CEP: 37203-202, Lavras, MG - Brasil. A autora Elisângela Jaqueline Magalhães está associada ao Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos. Caixa Postal 3037 - CEP: 37203-202, Lavras, MG - Brasil.

Informações de contato do autor correspondente

Luís Roberto Batista - Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos. Caixa Postal 3037 - CEP: 37203-202, Lavras, MG – Brasil; luisrb@ufla.br.

Versão curta do título

Caracterização do Queijo Minas Artesanal de Diamantina.

Escolha do periódico/tópico

Journal of Food Science: Microbiologia e Segurança Alimentar

RESUMO: Os queijos artesanais são apreciados no Brasil, sendo o estado de Minas Gerais destaque na produção de grande diversidade, como o Queijo Minas Artesanal (QMA). O modo de produção tradicional do QMA apresenta grande importância cultural e histórica, sendo hoje reconhecido como Patrimônio Imaterial da Humanidade. O Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural (QMACFN) se caracteriza pela presença predominante de fungos brancos que se desenvolvem em sua superfície durante o processo de maturação. Sua micobiota varia do núcleo à superfície do queijo, sendo influenciada por práticas de produção, interação com superfícies e condições ambientais. Este estudo investigou a influência sazonal na composição físico-química e micobiota do QMACFN, como também nas tábuas de maturação. As espécies *Geotrichum candidum*, *Diutina catenulata* e *Kluyveromyces lactis* foram predominantes na casca e na massa dos queijos durante as duas estações. Na estação chuvosa, as tábuas foram dominadas por *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *G. candidum* e *D. catenulata*. No período seco, prevaleceram *G. candidum*, *D. catenulata*, *K. ohmeri* e *Cladosporium cladosporioides*. A sazonalidade influenciou parâmetros físico-químicos, como teor de gordura e atividade de água. Correlações significativas entre a micobiota e os parâmetros físico-químicos evidenciam que a micobiota não apenas desempenha um papel fundamental nas características do produto, mas também é moldada por fatores intrínsecos ao queijo. Os resultados evidenciam a importância das práticas tradicionais de produção na qualidade dos queijos, no entanto, a presença de microrganismos que podem ser prejudiciais aponta a necessidade de um controle cuidadoso para garantir a segurança do produto.

Palavras-chaves: Queijo artesanal; Sazonalidade; Comunidade microbiana; Qualidade.

1. Introdução

Os queijos artesanais feitos com leite cru são apreciados no Brasil, refletindo a tradição e a diversidade cultural do país. Neste contexto, o estado de Minas Gerais se destaca como o principal produtor de queijos, sendo amplamente reconhecido pela diversidade desse produto. O leite cru combinado com o fermento endógeno natural, conhecido como “pingo”, e um período adequado de maturação proporcionam características sensoriais únicas ao Queijo Minas Artesanal (QMA). Seu modo de produção tradicional, passado entre gerações, apresenta grande importância cultural e histórica no contexto mineiro, sendo hoje reconhecido como Patrimônio Imaterial da Humanidade (UNESCO, 2024; Sant'anna et al., 2019).

O Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural (QMACFN) se caracteriza pela presença predominante de fungos brancos que se desenvolvem em sua superfície durante o processo de maturação (Minas Gerais, 2024). Reconhecido por suas características típicas, como a textura cremosa, sabor marcante e a presença de fungos superficiais, esse queijo tem sido cada vez mais apreciado pelos consumidores, o que lhe tem garantido prêmios em concursos nacionais e internacionais.

O queijo tem uma comunidade microbiana diversa, que pode variar do núcleo à superfície do queijo, sendo influenciada por fatores como práticas de produção aplicadas, a interação com superfícies, período de maturação e as condições ambientais da região produtora. As prateleiras de madeira, comuns nas queijarias por sua durabilidade, custo e disponibilidade, favorecem trocas microbiológicas com os queijos durante a maturação, influenciando sua ecologia microbiana e características sensoriais (Aviat et al., 2016; Furtado, 2019). Caracterizar essa microbiota é fundamental para compreender como esses diferentes fatores moldam a micobiota e sua relação com a qualidade e segurança do produto, considerando a possibilidade de contaminação por espécies indesejáveis (Kamimura et al., 2019; Jonnala et al., 2018).

Mudanças na microbiota ao longo do período de maturação são amplamente documentadas na literatura para diferentes queijos, com foco principalmente na comunidade bacteriana e de leveduras (Cardoso et al., 2015; Beresford & Williams, 2004; Martins et al., 2018; Castro et al., 2016), mas ainda existem poucos estudos sobre como a diversidade fúngica pode ser afetada pelas variações sazonais. Além disso, a maioria das pesquisas tem se concentrado na avaliação da micobiota dos queijos, sendo necessário ampliar a abordagem

para incluir outros fatores, como as tábuas empregadas na maturação, que também podem desempenhar um papel importante na diversidade microbiana.

Dentro desse contexto, este estudo teve como objetivo explorar a micobiota presente nos QMACFN produzido na região de Diamantina, MG, como também, nas tábuas de maturação, durante a estação seca e chuvosa. Adicionalmente, foi realizada a caracterização físico-química dos queijos, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada das particularidades dos queijos produzidos nesta região.

2. Materiais e Métodos

2.1 Coleta das amostras e amostragem

Foram selecionadas três queijarias certificadas, reconhecidas como produtoras do QMACFN, localizadas em municípios da região de Diamantina, no estado de Minas Gerais, Brasil (Fig. 1). Ao todo, 12 amostras de queijo, com média de 22 dias de maturação, foram coletadas durante as estações seca (n=6) e chuvosa (n=6), entre maio de 2022 e janeiro de 2023, respectivamente. Paralelamente à coleta das amostras de queijo, foram realizadas coletas na superfície das tábuas de madeira utilizadas para a maturação, em triplicata, empregando swabs estéreis (Silva et al., 2017). As amostras de queijo foram transferidas para sacos plásticos estéreis, e juntamente com a amostragem das superfícies, foram transportadas sob refrigeração em caixas térmicas com gelo reutilizável e armazenadas à -20 °C até realização das análises.

As amostras foram manipuladas em condições estéreis e subdivididas em dois grupos: amostras da casca (C) e amostras da massa (M). As mesmas foram obtidas a partir de fragmentos retirados de seis pontos equidistantes ao longo da superfície e da massa da peça de queijo inteiro.

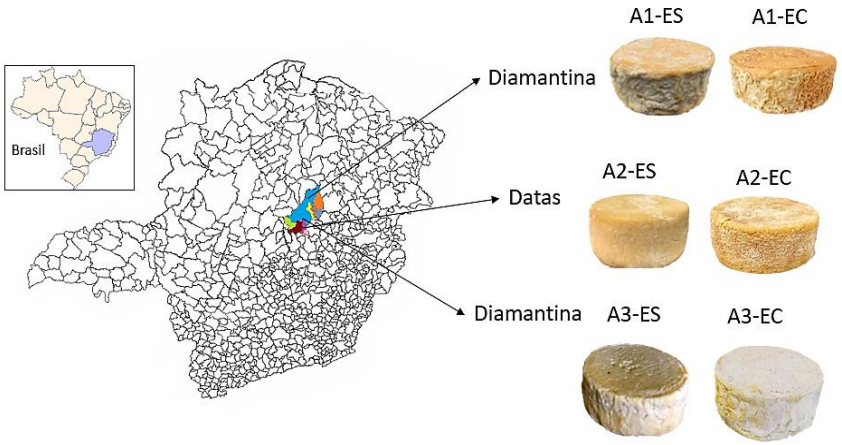


Figura 1 – Representação das amostras coletadas nas propriedades A1, A2 e A3 durante estação chuvosa (EC) e estação seca (ES) nos municípios localizados na região de Diamantina, no estado de Minas Gerais (MG), Brasil.

2.1 Caracterização da população fúngica

O isolamento de fungos filamentosos e leveduras das amostras de QMACFN e das superfícies das tábuas de maturação ocorreu por método dependente de cultivo. Para os queijos, 25g das amostras de casca e massa foram previamente pesados e homogeneizados em 225 mL de água peptonada a 0,1% usando um *Stomacher* (490 golpes por 3 min.). Em relação à coleta realizada na superfície das tábuas de maturação, o diluente de coleta, água peptonada 0,1% (10 mL), foi considerado como primeira diluição amostral. Em seguida procedeu-se com diluições sucessivas em água peptonada 0,1% (Silva et al., 2017). Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram transferidas e espalhadas para os seguintes meios de cultura: Ágar Dichloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (glicose: 10,0 g; peptona bacteriológica: 5,0 g; KH_2PO_4: 1,0 g; $MgSO_4.7H_2O$: 0,5 g; solução de rosa de bengala a 5%: 0,5 mL; dicloran: 1,0 mL; água destilada: 1000 mL; ágar: 15,0 g; cloranfenicol: 1 mg) e Dichloran Glicerol Medium Base (DG18) (dicloran: 1,0 mL; peptona bacteriológica: 5,0 g; KH_2PO_4: 1,0 g; $MgSO_4.7H_2O$: 0,5 g; glicerol: 220 g; ágar: 15,0 g; cloranfenicol: 1 mg; água destilada: 1000 mL) a fim de se determinar o maior número possível de espécies fúngicas. Após um período de incubação por 7 dias em BOD à 25°C, foi realizada a contagem das colônias e o resultado foi expresso em unidades formadores de colônias (UFC/g).

2.2.1 Purificação e identificação dos fungos

Para diferenciar os morfotipos presentes, foi realizada a caracterização morfológica (cor da colônia, cor do micélio, cor do reverso, presença de estrias e pigmentos no reverso, formato, tamanho, superfície, bordas e perfil) das colônias cultivadas nos meios de cultura. A técnica da raiz quadrada foi empregada para determinar o total de fungos a serem isolados. O isolamento das leveduras e dos fungos filamentosos foi realizado em meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MA) sendo incubados a 25 °C por 7 dias, no caso dos fungos filamentosos e a 28 °C por 48 h para as leveduras. Colônias puras foram obtidas por após repiques sucessivos para a correta identificação dos isolados.

Para a identificação dos fungos filamentosos, os mesmos foram crescidos em meios específicos dependendo do gênero encontrado. Os isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram inoculados em meios de cultura Ágar Czapeck Levedura (CYA) [K_2HPO_4: 1,0 g; concentrado czapecK: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g, ágar: 15,0 g, água destilada: 1000 mL; (concentrado czapecK: $NaNO_3$: 30,0 g, KCl: 5,0 g, $MgSO_4.7H_2O$: 5,0 g, $FeSO_4.7H_2O$: 0,1 g, $ZnSO_4.7H_2O$: 0,1 g, $CuSO_4.5H_2O$: 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: 1000 mL) 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 et al. (2010).

Uma suspensão etanólica foi prepara para identificação das leveduras por Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) conforme protocolo estabelecido pela Bruker-Daltonics (Normand et al., 2020). Colônias puras foram crescidas em meio Yeast Extract Peptone Glucose Ágar (YEPG) (extrato de levedura 10 g; peptona 20 g; glicose 20 g; ágar 15 g; água destilada 1000 mL; pH 3,5 ajustado com ácido cítrico) e incubadas a 28 °C por 18 horas. Uma porção das células cultivadas foi transferida com alça de inoculação de 10 µL, para microtubos estéreis contendo 300 µL de água ultrapura, com o objetivo de gerar uma suspensão homogênea das células transferidas para os tubos.

Após agitação em agitador tipo vórtex por 30 segundos, 900 µL de etanol puro foi adicionado e a suspensão foi novamente agitada.

A suspensão etanólica foi enviada em caixas térmicas contendo gelo reutilizável ao Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite (Qualileite) da Universidade de São Paulo (USP-Pirassununga), para análise do perfil de proteínas ribossomais e possível identificação das espécies de leveduras através do equipamento MALDI Flex Target (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os isolados foram considerados identificados com base na pontuação do BioTyperlog (score > 1,70).

Os fungos identificados foram depositados na Unidade de Recursos Microbiológicos da Universidade Federal de Lavras, MG.

2.3 Avaliação dos parâmetros físico-químicos

As amostras de casca e massa dos queijos foram finamente trituradas e submetidas, em triplicata, à determinação dos teores de umidade, gordura, gordura no extrato seco, cloreto de sódio, sal na umidade, pH e atividade de água (Aw) de acordo com os procedimentos da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006), Pereira et al. (2001) e da Instrução Normativa Nº 68/2006, que define os Métodos Analíticos Físico-Químicos Oficiais, para Controle de Leite e Produtos Lácteos (BRASIL, 2006).

2.4 Análise estatística

A comparação dos valores médios obtidos foi realizada por análise de variância (ANOVA) com posterior teste de Tukey, para comparação entre as amostras e teste F, para avaliação entre as épocas do ano a nível de 5% de significância. Para estabelecer a correlação entre a micobiota e parâmetros físico-químicos, os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados usando o software R com o pacote Corrplot, versão 4.4.2 (R Core Team, 2024).

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização da população fúngica

A população de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de queijo variou de 5,43 log UFC/g (A1M) a 7,53 log UFC/g (A1C) na estação seca e de 5,69 log UFC/g (A2M) a 7,79 log UFC/g (A1C) durante a estação chuvosa. Já as tábuas de maturação, mostraram contagens

entre 6,74 log UFC/cm^2 (A3) e 7,91 log UFC/cm^2 (A2), durante as estações no ano (Tabela 1). Ressalta-se que nenhuma das propriedades avaliadas neste estudo utilizava meios artificiais, como umidificadores ou ar condicionado, para controle das condições ambientais.

Tabela 1- População fúngica total presente nas amostras da casca (C) e massa (M) dos queijos e tábuas de maturação durante estação seca e chuvosa.

Amostra	Queijo (Log UFC/g)		Tábuas de maturação (Log UFC/cm^2)	
	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa
A1M	5,43 ± 0,29^{bA}	5,76 ± 0,03^{bA}	7,83 ± 0,54^{aA}	7,82 ± 0,81^{aA}
A1C	7,53 ± 0,23^{aA}	7,79 ± 0,04^{aA}		
A2M	5,56 ± 0,01^{bA}	5,69 ± 0,01^{bA}	8,28 ± 0,48^{aA}	7,64 ± 0,17^{aA}
A2C	7,48 ± 0,10^{aA}	7,61 ± 0,06^{aA}		
A3M	5,70 ± 0,25^{bA}	5,77 ± 0,19^{bA}	7,47 ± 0,07^{aA}	6,74 ± 0,01^{aA}
A3C	7,30 ± 0,21^{aA}	7,60 ± 0,22^{aA}		

Valores médios na mesma linha com letras maiúsculas diferentes e na mesma coluna com letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente (p≤0,05) pelo teste F e teste de Tukey, respectivamente.

As estações do ano não impactaram significativamente (p>0,05) a população fúngica nas cascas, massas de queijo e tábuas de maturação. Sugerindo que a microbiota fúngica pode estar bem estabelecida ao ambiente específico de cada propriedade, formando comunidades que limitam a colonização por microrganismos externos sazonais.

Cardoso et al. (2015) observaram que a quantidade de leveduras no QMACFN da microrregião do Serro não varia com as estações, mas com o tempo de maturação, estabilizando após 15 dias. Ritschard e Schuppler (2024) complementam que o equilíbrio microbiano no queijo durante a maturação ocorre pela competição por nutrientes, esgotamento de substratos e adaptação às condições locais.

A micobiota das cascas e massas dos queijos apresentou diferenças significativas (p<0,05) ao longo das estações, com maiores contagens na casca. Rocha (2023) também observou maior população fúngica na casca (7,91 log) em comparação à massa (5,28 log) do QMACFN. A maior complexidade da microbiota na casca se deve ao contato direto com o ambiente durante a maturação, favorecendo a colonização por fungos filamentosos adaptados ao ambiente (Papadimitriou et al., 2015).

A maior diversidade fúngica foi observada durante a estação chuvosa, com 16 espécies nos queijos e 23 nas tábuas de maturação, enquanto na estação seca foram identificadas 13 e 14 espécies, respectivamente. Estudos anteriores, como os de Martin et al. (2023) e Aragão

(2018), também relataram maior diversidade fúngica em queijos Minas artesanais produzidos na estação chuvosa. Sun e D'Amico (2023) constataram que em condições ambientais modelo, como verão à 25 °C e 65% de umidade relativa (UR), favorecem maior diversidade na composição fúngica em formas de madeira utilizadas na produção de queijos artesanais, em comparação ao inverno com 15 °C e 35% UR.

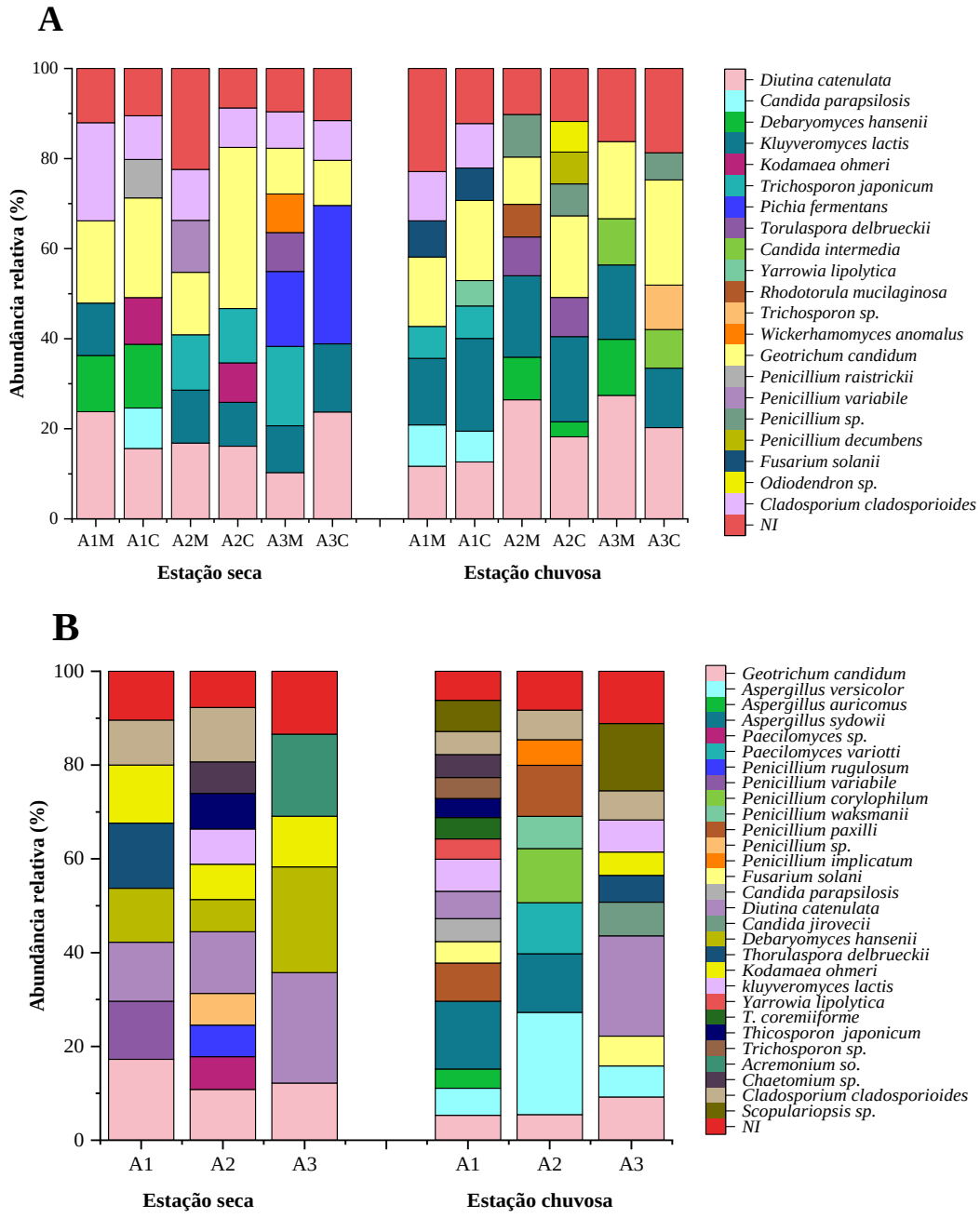


Figura 2 – Abundância relativa das espécies fúngicas identificadas nas amostras de casca e massa de queijo (A) e nas tábuas de maturação (B) durante as estações seca e chuvosa.

A estação seca na região de Diamantina compreende os meses de abril a setembro com UR e a temperatura média mensais, respectivamente, variando de 53% a 73% e 17,05 °C a 20,84 °C. Já a estação chuvosa, que vai de outubro a março, apresenta UR média mensal entre 61% e 83% e temperatura variando de 20,32 °C a 22,65 °C entre os meses da estação (INMEP, 2024). Thunyaharn et al. (2021) destacam que alta UR (>70%) e temperaturas moderadas (20-30 °C) favorecem o crescimento fúngico, enquanto baixa UR e temperaturas extremas o inibem. Assim, a temperatura média de 21,48 °C e UR de 72% em Diamantina nos meses chuvosos provavelmente favoreceram o crescimento fúngico nos queijos e nas tábuas de maturação.

Observou-se uma maior diversidade de fungos filamentosos, ainda que em baixa abundância, especialmente na casca dos queijos. Entre as espécies fúngicas identificadas na estação chuvosa estão *Penicillium decumbens* (A2C: 7,06%), *Fusarium solani* (A1C: 7,21% e A1M: 8,02%), *Penicillium* sp. (A2M: 9,43%, A2C: 7,06% e A3C: 6,03%), *Oidiodendron* sp. (A2C: 6,79%) e *Cladosporium cladosporioides* (A1C: 9,84% e A1M: 10, 93%). Na estação seca *C. cladosporioides* esteve presente em todas as amostras com abundâncias variando entre 8,10% (A3M) a 21,78% (A1M), *Penicillium raistrickii* foi identificado apenas na casca da amostra A1 (8,51%) e *Penicillium variabile* no interior da amostra A2 (11,54%).

Da mesma forma que para os queijos, espécies de fungos filamentosos estiveram presentes nas tábuas de maturação ao longo das duas estações, com uma maior diversidade durante a estação chuvosa, composta principalmente por diferentes espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. *Aspergillus versicolor* esteve presente em todas as queijarias com maior abundância na queijaria A2 (21,83%), *Aspergillus sydowii* e *Penicillium paxilli* foram observados nas queijarias A1 (14,45% e 8,15%, respectivamente) e A2 (12,50% e 10,88%, respectivamente), o gênero *Scopulariopsis* esteve presente nas queijarias A1 (6,67%) e A3 (14.34%). Na estação seca, estiveram presentes principalmente *P. variabile* (A1: 12,40%), *C. cladosporioides* (A1: 9,58% e A2: 11,59%) e *Acremonium* sp. (A3: 17,50%).

Souza et al. (2021) identificaram espécies semelhantes no ar de salas de maturação de queijarias no Serro, Minas Gerais, incluindo *Trichosporon japonicum*, *A. versicolor*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium implicatum*.

Espécies fúngicas típicas do solo, como *Oidiodendron*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Penicillium*, são frequentemente relatadas em queijos artesanais maturados (Kothe et al., 2022; Aragão et al., 2022; Prates,

2024). Esses fungos podem colonizar o queijo a partir do leite, ar ambiente, utensílios e superfícies de contato como as tábuas de maturação, que atuam como substrato para a microbiota e veículo de disseminação de fungos durante a maturação (Hymery et al., 2014; Mounier et al., 2006).

Sabe-se que os microrganismos autóctones são fundamentais no estabelecimento de características sensoriais distintas responsáveis pela caracterização de queijos artesanais. Entretanto, o crescimento descontrolado de fungos nos queijos deve ser visto com atenção, em função da possibilidade de contaminação por espécies deteriorantes e toxigênicas que podem comprometer a qualidade e segurança do produto (Hymery et al., 2014).

As tábuas de maturação retêm umidade e nutrientes, facilitando a colonização por fungos do ambiente e do queijo em maturação (Lacorte et al., 2022). Os resultados mostram que as tábuas de maturação podem hospedar espécies fúngicas potencialmente toxigênicas, como *A. versicolor* (A1M: 5,77%; A2M: 21,83% e A3M: 6,60%) e *A. sydowii* (A1M: 14,45% e A2M:12,5%), relacionadas à produção de esterigmatocistina e *Penicillium rugulosum* (A2M: 6,74%) associados à produção de ocratoxina A (Zhang et al., 2016; Dobson et al., 2017). No entanto, a presença desses fungos não implica necessariamente a produção de micotoxinas, pois sua produção está condicionada a diversos fatores, como as características do ambiente, do próprio queijo e as interações com outros microrganismos (Hymery et al., 2014).

A micobiota dos queijos, especialmente na superfície, foi menos diversa que a das tábuas de maturação. Busetta et al. (2024) relataram que prateleiras de madeira hospedam fungos como *A. sydowii*, *A. versicolor*, *Penicillium* sp. e *Acremonium* sp., mas apesar de terem identificado estas espécies nas prateleiras de maturação, as amostras de queijo associadas não apresentaram estas espécies ou foram observadas em níveis baixos. Hymery et al. (2014) explicam que a composição do queijo e a microbiota natural atuam como barreiras, reduzindo a proliferação de fungos do ambiente de produção.

A interação microbiológica entre tábuas de maturação e a superfície dos queijos é significativa, mas as comunidades microbianas não são idênticas. Essa troca resulta da proximidade física e das condições ambientais compartilhadas, como temperatura, umidade e circulação de ar. Diferenças na micobiota são influenciadas por fatores como composição e idade da madeira, métodos de limpeza, disponibilidade de nutrientes e propriedades físico-químicas dos queijos (Busetta et al., 2024; Mounier et al., 2006).

Apesar da diversidade de fungos filamentosos presente, todas as amostras de queijo das três propriedades apresentaram uma população superior de leveduras durante as duas estações do ano. *Geotrichum candidum*, *Diutina catenulata* e *Kluyveromyces lactis* foram as espécies predominantes em todas as amostras de casca e massa dos queijos produzidos ao longo das duas estações do ano. Durante a estação seca, *G. candidum* apresentou abundância relativa entre 10,03% (A3C) e 35,74% (A2C), enquanto *D. catenulata* variou de 10,28% (A3M) a 23,80% (A1M). Na estação chuvosa, a micobiota foi dominada por *G. candidum*, *D. catenulata* e *K. lactis* que mostraram porcentagens entre 10,49% (A2M) a 23,34% (A3C), 11,68% (A1M) a 27,43% (A3M) e 13,20% (A3C) a 20,58% (A1C), respectivamente.

Martin et al. (2023) e Cardoso et al. (2015) identificaram essas espécies em queijos da Canastra nas estações chuvosa e seca. A presença frequente dessas espécies em queijos artesanais de diversos países (Kothe et al., 2022; Aragão et al., 2022; Cardinali et al., 2021) sugere sua relevância na microbiota e na qualidade dos queijos.

Em relação às tábuas de maturação, *G. candidum* e *D. catenulata* também mostraram predominância ao longo das duas estações do ano. Na estação seca, *G. candidum* esteve presente nas três queijarias avaliadas com abundâncias relativas variando entre 10,83% (A2) e 17,24% (A1) e entre 5,32 (A1) e 9,23 (A3) na estação chuvosa. *D. catenulata* foi identificada em todas as amostras durante a estação seca com abundância variando de 12,58% (A1) a 23,55% (A3), na estação chuvosa esta levedura foi observada apenas nas amostras A1 (5,84%) e A3 (21,37%). Outras espécies que estiveram presentes em todas as amostras durante a estação seca foram: *Debaryomyces hansenii* (A1: 11,50%, A2: 6,88%, A3: 22,52%) e *Kodamaea homeri* (A1: 10,81%, A2:7,49%, A3: 10,81%).

Os resultados estão em consonância com as observações feitas por Didiene et al. (2012) ao caracterizarem biofilmes microbianos em cubas de madeira utilizadas na produção de um tipo de queijo francês. Os autores observaram a presença de *G. candidum* em maior abundância, seguido de *K. lactis* e *D. hansenii*.

G. candidum é encontrado em diversos habitats, incluindo o leite cru (Biocalti et al., 2020), desempenha um papel essencial na maturação de queijos através da produção de enzimas que atuam na degradação de proteínas e gorduras e formação de compostos aromáticos (Boutrou e Guéguen, 2005). A atuação do *G. candidum* como agente de biocontrole inibindo o crescimento de microrganismos indesejados, como bactérias patogênicas e fungos toxigênicos, também sido amplamente estudada (Sipiczki e Hrabovszki,

2023; Nielson, Firsvad e Nielson, 1998; Kawtharani et al., 2020; Mitra et al., 2023). Seu importante papel na qualidade e segurança do QMACFN foi reconhecido na regulamentação do QMACFN (Portaria Nº 2307/2024), destacando sua importância para a valorização do queijo no mercado (Minas Gerais, 2024).

D. catenulata e *K. lactis* também contribuem significativamente na promoção de atributos sensoriais em queijos artesanais em função das suas atividades proteolíticas e lipolíticas (Cardoso et al., 2015; Biocalti et al., 2020). *K. lactis* também apresenta ação probiótica e antagonismo contra patógenos como, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. (Fadda et al., 2017; Ceugniez et al., 2017). *D. hansenii* é frequentemente encontrada em tábuas de maturação de queijos artesanais (Mounier et al., 2006; Busetta et al., 2024).

Algumas espécies de leveduras se apresentaram-se unicamente em determinada época do ano e em amostras de queijo de queijarias específicas. Na estação seca, *Wickerhamomyces anomalus* esteve presente apenas no interior da amostra da queijaria A3 (8,75%), por sua vez *Pichia fermentans* foi observada na casca (30,72%) e interior (16,64%) da mesma amostra. Estas leveduras não foram identificadas nas tábuas de maturação da queijaria avaliada. *W. anomalus* foi relatada como essencial no processo de maturação do queijo Fossa, um tipo de queijo italiano, contribuindo para a produção de compostos de aroma e sabor. Além disso, diferentes estudos reportam sua atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *Penicillium expansum* (Biagioti et al., 2018; Haïssam, 2011; Calazans et al., 2020). *P. fermentans* também integra a micobiota de queijos artesanais (Bintsis et al., 2021; Ouadghiri et al., 2014) e seu potencial efeito na redução de ocratoxina A em grão de café contaminadas artificialmente com *Aspergillus westerdijkiae* foi relatado por Pereira et al. (2016).

Durante a estação chuvosa, *Yarrowia lipolytica* foi encontrada apenas na superfície do queijo da queijaria A1 (5,63%) e também esteve presente na tábua de maturação da mesma queijaria (4,32%), *Rhodotorula mucilaginosa* esteve presente na massa do queijo A2 (7,25%) e *Candida intermédia* foi observada na casca (8,58%) e interior (10,25%) da amostra da queijaria A3. Cardoso et al. (2015) observaram a predominância de *C. intermedia* e *R. mucilaginosa* no queijo do Serro sendo responsáveis pela formação de características sensoriais típicas deste queijo. *Y. lipolytica* é onipresente e cresce naturalmente em superfícies de queijo, desempenhando papel importante na produção de compostos aromáticos resultantes da sua atividade lipolítica pronunciada (Sørensen et al., 2011; Irlinger

et al., 2015). A capacidade de degradação de micotoxinas das leveduras *R. mucilaginosa* e *Y. lipolytica* foi relata foi relatada por Li et al. (2019) e Yang et al. (2015) em ensaios *in vitro*.

Apesar das semelhanças observadas entre as queijarias, a micobiota particular de cada queijaria reflete as condições ambientais e disponibilidade de nutrientes que selecionam o crescimento microbiano, além disso as práticas de produção de cada queijaria também podem favorecer a presença de determinadas espécies, conferindo identidade ao produto e valorizando sua origem artesanal e *terroir* próprio.

3.4 Avaliação dos parâmetros físico-químicos

O teor de umidade mostrou semelhanças significativas ($p>0,05$) entre as amostras de casca e massa dos queijos avaliados ao longo das estações do ano (Tabela 2). O teor de umidade na massa dos queijos variou de 39,53% (A3M) à 45,86% (A2M) durante o ano. Já a superfície dos queijos, demonstrou valores variando de 36,25% (A3C) à 43,94% (A2C). Observações semelhantes foram relatadas por Rocha (2023) ao avaliar amostras de QMACFN da microrregião do Cerrado com teores médios entre 50,6% (massa) e 48,7% (casca) nas amostras com em média, 23 dias de maturação.

Houve influência significativa ($p\leq0,05$) das estações do ano no teor de umidade apenas para a amostra A3. O teor de umidade dos queijos afeta diretamente sua qualidade e suas variações podem ser atribuídas às práticas de produção artesanal, o que dificulta sua padronização (Ide & Benedet, 2002). Os produtores utilizam da sua experiência e conhecimento tradicional para controlar a ação de fatores ambientais sob as características do queijo, como as variações do tamanho do grão durante o corte da massa e força durante prensagem da mesma (Valente et al., 2024).

Todas as amostras atenderam o preconizado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do QMACFN (Brasil, 2024) que determina um valor máximo de umidade de 45,9%, sendo classificados como queijos de média umidade, de acordo com a Portaria nº 146/1996, sendo geralmente conhecidos como queijos de massa semidura (Brasil, 1996).

O percentual de gordura nas amostras variou de 27,50% (A2M) a 35% (A1C). Quanto à gordura no extrato seco (GES), os valores variaram de 46,80% (A1C) a 60,95% (A1C). A amostra A2M apresentou um valor significativamente menor ($p\leq0,05$) na estação chuvosa, tanto em relação à gordura quanto a GES. As estações do ano mostraram efeito significativo sobre a

gordura e a GES (p≤0,05) sobre as amostras de queijo da propriedade A1 e das propriedades A1 e A3, respectivamente.

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos das amostras de QMACFN da microrregião de Diamantina, MG, coletadas durante a estação seca e chuvosa.

Parâmetros	Estação	Amostras					
		A1M	A1C	A2M	A2C	A3M	A3C
Umidade (%)	Seca	40,78 ± 1,72^{aA}	37,80 ± 7,14^{aA}	45,86 ± 0,41^{aA}	43,94 ± 1,10^{aA}	39,53 ± 3,49^{aB}	36,25 ± 4,95^{aB}
	Chuvosa	45,15 ± 0,83^{aA}	42,59 ± 0,34^{aA}	44,34 ± 2,83^{aA}	40,25 ± 0,67^{aA}	45,79 ± 0,91^{aA}	43,18 ± 0,23^{aA}
Gordura (%)	Seca	29,50 ± 0,71^{aB}	29,00 ± 1,41^{aB}	27,50 ± 2,12^{aA}	29,50 ± 0,71^{aA}	30,50 ± 0,71^{aA}	31,00 ± 2,83^{aA}
	Chuvosa	33,00 ± 1,41^{aA}	35,00 ± 1,41^{aA}	28,00 ± 0,71^{bA}	31,00 ± 1,41^{abA}	31,00 ± 1,18^{abA}	33,50 ± 2,12^{aA}
Gordura no extrato seco (%)	Seca	49,81 ± 0,25^{aB}	46,80 ± 3,10^{aB}	50,78 ± 3,53^{aA}	52,63 ± 2,29^{aA}	50,48 ± 1,74^{aA}	48,60 ± 0,66^{aA}
	Chuvosa	60,14 ± 1,67^{aA}	60,95 ± 2,10^{aA}	49,43 ± 1,24^{bA}	51,86 ± 1,78^{abA}	58,28 ± 3,65^{abB}	58,96 ± 3,96^{aB}
Sal (%)	Seca	1,58 ± 0,64^{aA}	1,10 ± 0,09^{aA}	1,15 ± 0,54^{aA}	1,63 ± 0,56^{aA}	1,85 ± 0,12^{aA}	1,72 ± 0,12^{aA}
	Chuvosa	1,08 ± 0,07^{aA}	0,81 ± 0,09^{aA}	1,18 ± 0,07^{aA}	0,91 ± 0,07^{aA}	1,70 ± 0,09^{aA}	1,20 ± 0,09^{aA}
Sal na umidade (%)	Seca	4,16 ± 1,18^{aA}	2,98 ± 0,79^{aA}	2,51 ± 1,21^{aA}	3,05 ± 0,73^{aA}	4,82 ± 0,55^{aA}	4,68 ± 1,17^{aA}
	Chuvosa	2,35 ± 0,27^{aB}	1,81 ± 0,21^{aA}	2,69 ± 0,04^{aA}	2,23 ± 0,16^{aA}	3,69 ± 0,18^{aA}	2,42 ± 0,65^{aB}
pH	Seca	5,54 ± 0,46^{bcA}	5,91 ± 0,05^{bA}	4,90 ± 0,27^{cA}	6,85 ± 0,18^{aA}	4,92 ± 0,01^{cA}	5,73 ± 0,13^{bA}
	Chuvosa	5,19 ± 0,10^{cA}	6,34 ± 0,23^{aA}	5,28 ± 0,08^{cA}	6,18 ± 0,34^{abA}	5,53 ± 0,04^{bcA}	6,56 ± 0,06^{aA}
Atividade de água	Seca	0,966 ± 0,01^{aA}	0,943 ± 0,00a^{bA}	0,959 ± 0,00^{aA}	0,918 ± 0,02^{bB}	0,951 ± 0,00^{abB}	0,921 ± 0,02^{bB}
	Chuvosa	0,972 ± 0,00^{aA}	0,971 ± 0,01^{aA}	0,962 ± 0,00^{aA}	0,952 ± 0,02^{aA}	0,979 ± 0,00^{aA}	0,976 ± 0,02^{aA}

Valores médios na mesma linha com letras maiúsculas diferentes e na mesma coluna com letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente (p≤0,05) pelo teste F e teste de Tukey, respectivamente.

A gordura no leite é influenciada por fatores como raça, período de lactação e nutrição dos animais, os quais variam ao longo das estações do ano (Santis, 2016). Embora o teor de GES de queijos geralmente apresente menor variação sazonal devido à compensação da umidade (Costa Júnior et al., 2009), o presente estudo observou variações significativas na GES, que possivelmente são atribuídas a diferenças na composição do leite, práticas de manejo e variações nas técnicas de fabricação e maturação entre as estações.

Todas as amostras produzidas durante a estação seca, bem como as amostras A2 e A3 obtidas na estação chuvosa, foram classificadas como queijos gordos, com teor de gordura no extrato seco variando entre 45,0% e 59,9%. Já a amostra A1, coletada na estação chuvosa, foi classificada como queijo extragordo de acordo com a Portaria nº 146/1996 (Brasil, 1996).

O teor de sal das amostras de queijo apresentou valores na faixa de 0,81% (A1C) à 1,85% (A3M). não sendo observadas diferenças significativas (p≤0,05) tanto entre as amostras quanto entre as estações do ano. Valente et al. (2024) encontraram valores de sal variando entre 1,26% e 2,35% em queijos Minas artesanais do Campo das Vertentes, ao longo das estações do ano.

Quanto ao teor de sal na umidade, foram observadas semelhanças significativas ($p \leq 0,05$) entre as amostras analisadas ao longo das estações e pode-se notar influência ($p > 0,05$) das estações do ano para as amostras A1M e A3C. Moreno (2013), ao avaliar queijos artesanais produzidos da região do Campo das Vertentes, relatou significativa variação de percentual de sal na umidade tanto entre produtos de um mesmo lote quanto entre diferentes estações do ano. O processo de salga do queijo visa ajustar sabor, umidade e inibir o crescimento de patógenos. Devido à produção artesanal, a salga não segue um procedimento padronizado, variando conforme o método de cada produtor, que define a quantidade de sal, o tempo de exposição e a viragem dos queijos (McSweeney & Fox, 2004).

Os valores de pH encontrados nas amostras de casca e massa dos queijos variaram de 4,90 (A2M) à 6,85 (A2C) sendo o parâmetro que mais mostrou diferenças significativas entre as amostras ($p \leq 0,05$). De forma semelhante, Aragão et al. (2022) observaram valores de pH entre 5,29 e 5,53 em amostras de QMACFN da Canastra produzidos durante a estação chuvosa, observando variações significativas entre as queijarias avaliadas. De uma forma geral, o pH da superfície dos queijos foi maior que o da massa. Durante a maturação, as leveduras metabolizam o lactato produzindo CO_2 e H_2O e desaminam aminoácidos com produção de NH_3 provocando mudança nas características do meio com a elevação do pH, de aproximadamente 5,0 a maior que 6,5. Surge, então, um gradiente de pH, no qual o interior se encontra mais ácido que a superfície (Mcsweeney et al., 2004).

Em relação à época do ano, pH foi influenciado apenas na amostra A3C, que apresentou valores de 5,73 e 6,56 para estação seca e chuvosa respectivamente. Valente et al. (2024) observou que as amostras de queijos artesanais avaliadas o pH não foi significativamente influenciado pela época do ano. As semelhanças nos valores de pH entre as estações podem ser justificadas pelo uso, em muitas regiões produtoras de queijos Minas artesanais, de quantidades maiores de pingo na estação seca. Essa prática é adotada para equilibrar os efeitos das temperaturas mais baixas no processo de fermentação e coagulação (Martins, 2006)

Durante a estação seca, a Aw apresentou variações significativas ($p \leq 0,05$) entre as amostras analisadas, com menores valores registrados na casca em comparação à massa. Já na estação chuvosa, foi observada semelhança significativa ($p > 0,05$) entre todas amostras avaliadas. Para as amostras A2C, A3M e A3C foi possível notar influência significativa ($p \leq 0,05$) das estações do ano para o valor de Aw, sendo possível observar, de maneira geral, menores

valores de Aw para as amostras produzidas durante a estação seca em comparação à estação chuvosa. Moreno (2013) reportou que este parâmetro se comporta de forma bastante heterogênea tantos entre as queijarias quanto entre períodos do ano, tendo redução devido à desidratação determinada pelas condições ambientais onde os queijos se encontram para maturação. Além disso, durante a estação seca, a umidade do ambiente é reduzida, intensificando a desidratação do queijo. Isso resulta em menores valores de Aw, especialmente na superfície (Bank, 1998).

3.5 Correlação entre micobiota e parâmetros físico-químicos

A análise de correlação entre a abundância relativa de espécies fúngicas dominantes e atributos físico-químicos de amostras de QMACFN produzidas ao longo das estações do ano foi realizada e as correlações significativas (p≤0,05) são exibidas na Figura 2.

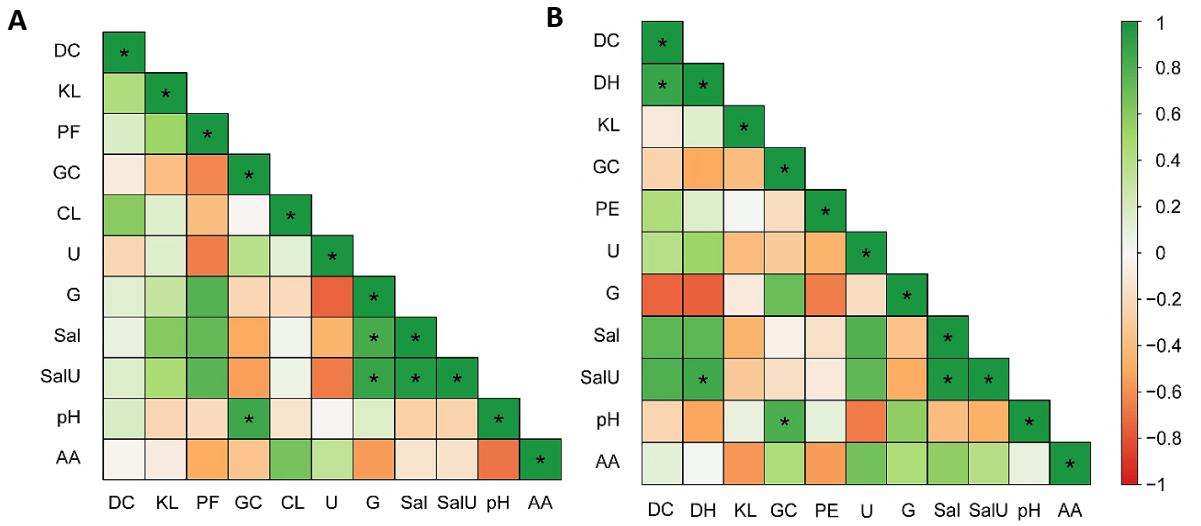


Figura 3 – Mapa de calor referente à correlação entre comunidades fúngicas e aspectos físico-químicos dos queijos avaliados durante estação seca (A) e chuvosa (B). A escala de cores indica a natureza da correlação, com verde indicando uma correlação positiva e vermelho indicando uma correlação negativa com base no teste de correlação de Pearson (p≤0,05). O "*" indica correlações significativas. DC: *D. catenulata*; KL: *K. lactis*; PF: *P. fermentans*; GC: *G. candidum*; CL: *C. cladosporioides*; DH: *D. hansenii*; PE: *Penicillium* sp.; U: Umidade; G: Gordura; SalU: Sal na umidade; AA: Atividade de água.

Interações significativamente positivas (p≤0,05) entre *G. candidum* e o pH dos queijos produzidos nas duas épocas do ano foram observadas. No período de estiagem, este fungo esteve em maior abundância nas amostras as amostras A1C (22,14%) e A2C (35,74%) às quais,

por sua vez, apresentaram os maiores valores de pH, 5,91 e 6,95 respectivamente, durante o mesmo período. Mesma observação pode ser feita no período das águas, em que as amostras A1C (17,79%), A2C (18,13%) e A3C (23,34%) com maiores populações de *G. candidum*, apresentaram os maiores índices de pH: A1C (6,34), A2C (6,18) e A3C (6,56).

G. candidum apresenta características acidotolerantes, podendo se desenvolver em uma ampla faixa de pH (3 à 11) com ótimo entre 6-7. Este fungo coloniza rapidamente a superfície de queijos maturados dentro de 1–2 dias após a fabricação e os números continuam a aumentar até 7–10 dias após a fabricação. Durante esse período de colonização, *G. candidum* metaboliza o ácido lático presente levando à desacidificação do meio, favorecendo dessa forma, atuação de enzimas e desenvolvimento de microbiota importante durante a maturação (Boutrou; Guéguen, 2005; Eliskases-Lechner et al., 2011).

O teor de sal na umidade foi positivamente correlacionado com a abundância relativa da espécie *D. hansenii* durante a estação chuvosa. Nesta estação, as amostras que apresentaram maior abundância relativa da espécie apresentaram os maiores teores de sal na umidade, destacando-se A2M (2,69%) e A3M (3,69%). Espécies de *Debaryomyces*, especialmente *D. hansenii*, são altamente tolerantes a ambientes salinos (Martin & Cotter, 2023), o que explica sua correlação positiva com o teor de sal na umidade dos queijos. Em estudo similar, Demerci (2024) relatou que a abundância de *D. hansenii* no queijo Kuflu, típico da Turquia, foi negativamente correlacionada com o teor de umidade, adaptando-se bem a ambientes com baixa umidade e alta concentração de sal.

Ainda na estação chuvosa, pode-se notar correlação significativa positiva ($p \leq 0,05$) entre a abundância relativa das espécies *D. catenulata* e *D. hansenii*. Assim como o gênero *Debaryomyces*, *Candida* (atualmente reclassificado como *Diutina* para algumas espécies) também tem sido relatado como tolerante a ambientes com alto teor de sal (Mcsweeney, 2007; Loureiro et al., 2005) o que pode justificar a correlação positiva entre *D. catenulata* e *D. hansenii* nos queijos, em função capacidade adaptativa que lhes permitem coexistir no mesmo meio.

Correlações positivas entre os atributos físico-químicos também foram observadas. Durante as duas estações, os teores de sal e sal na umidade foram positivamente correlacionados, o que já era esperado, visto que o sal na umidade representa a fração do sal dissolvido na água disponível no queijo. Na estação seca o teor de gordura foi positivamente

correlacionado com os teores de sal e sal na umidade, o que pode estar relacionada à concentração relativa dos componentes sólidos na matriz durante a estação seca.

O ecossistema microbiano determina e, ao mesmo tempo, é determinado por fatores intrínsecos ao queijo e fatores extrínsecos (Montel, et al. 2014; Aragão 2018). Dessa forma, a ocorrência e a abundância das diferentes espécies fúngicas são influenciadas não somente pelos parâmetros intrínsecos e específicos do queijo, como também são dependentes das condições gerais do meio de produção desse queijo. O entendimento de todas essas relações ainda é desafiador, exigindo estudos mais aprofundados para desvendar os mecanismos envolvidos e sua variabilidade, ressaltando assim a importância desse estudo.

4. Conclusão

O presente estudo foi o primeiro a caracterizar a micobiota presente nos QMACFN produzidos na microrregião de Diamantina, MG, ao longo das estações do ano. Os resultados evidenciaram que embora a micobiota fúngica limite a colonização por microrganismos sazonais, apresenta variações na diversidade de espécies fúngicas conforme as condições ambientais sazonais. A estação chuvosa, em particular, favoreceu a proliferação de certas espécies, indicando que as condições ambientais dessa estação influenciam diretamente a microbiota fúngica dos queijos. Em relação à caracterização físico-química dos queijos, foi observada influência da época no ano, destacando os parâmetros teores de gordura e atividade de água.

Este estudo identificou correlações significativas entre a micobiota e os parâmetros físico-químicos dos queijos, evidenciando que a comunidade microbiana não apenas desempenha um papel fundamental na definição das características do produto, mas também é moldado por fatores intrínsecos ao queijo.

Os resultados mostram a importância das práticas tradicionais de produção, como o uso de tábuas de madeira, para manter a identidade do queijo e reforçar suas características únicas. No entanto, a presença de microrganismos que podem ser prejudiciais aponta para a necessidade de um controle cuidadoso para garantir a segurança do produto.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecem aos produtores de queijo da região de Diamantina, Minas Gerais, Brasil, pelo fornecimento de amostras, bem como às agências Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo financiamento desta pesquisa.

Conflitos de interesse

Todos os autores declaram não ter qualquer potencial conflito de interesse relacionado ao presente artigo.

Referências

AOAC. (2206). *Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists* (18rd ed.) Gaithersburg, Maryland.

Aragão M. O., Evangelista S. R., Passamani F. R. F., Guimarães J. P. M., Abreu L. R. & Batista L. R. (2022). Fungal community and physicochemical profiles of ripened cheeses from the Canastra of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Food Science and Technology*, 59(12), 4685-4694, https://doi.org/10.1007/s13197-022-05548-4.

Aragão, M. de O. P. (2018). *Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em Queijo Minas Artesanal das microrregiões do Serro e da Serra da Canastra*. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Aviat, F., Gerhards, C., Rodríguez-Jerez, J.J., Michel, V., Bayon, I.L., Ismail, R., & Federighi, M. (2016). Microbial Safety of Wood in Contact with Food: A Review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15 (3), 491-505, https://doi.org/10.1111/1541-4337.12199.

Bank, J.M. (1998). Cheese. In: Ed. Early, R. *The Technology of Dairy Products*, 2 ed., (p. 81-122), London.

Beresford, T. & Williams, A. (2004). The Microbiology of Cheese Ripening. In: *General Aspects* (pp.287-317). Publisher: Elesvier Academic Press, https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80071-X.

Biagiotti C., Ciani M., Canonico L. & Comitini F. (2018). Occurrence and involvement of yeast biota in ripening of Italian Fossa cheese. *European Food Research and Technology*, 244(11), 1921-1931, https://doi.org/10.1007/s00217-018-3104-6.

Bintsis T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiolology*, 7(4):447-470, https://doi.org/10.3934/microbiol.2021027.

Biocalti F., Andrighetto C., Bottero M. T. & Dalmasso A. (2020). Microbial characterization of an artisanal production of Robiola di Roccaverano cheese. *Journal of Dairy Science*, 103(5), https://doi.org/10.3168/jds.2019-17451.

Boutrou R. & Guéguen M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiolology*, 102(1), 1-20. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028. PMID: 15924999.

BRASIL. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. (2006). Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF.

BRASIL. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (1996). Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF.

Busetta G., Garofalo G., Claps S., Sardina M. T., Franciosi E., Alfonzo A., Francesca N., Moschetti G., Settanni L., & Gaglio R. (2024). The wooden shelf surface and cheese rind mutually exchange microbiota during the traditional ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 409 (110478), https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110478.

Calazans G., Silva J., Delabeneta M., Filho P., Paris A., Auler M., Menolli R., Paula C., Simão R. & Gandra, R. (2020). Antimicrobial activity of *Wickerhamomyces anomalus* mycocins against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from meats. *Food Science and Technology*. 41. https://doi.org/10.1590/fst.39319.

Cardinali F., Ferrocino I., Milanović V., Belleggia L., Corvaglia M. R., Garofalo C., Foligni R., Mannozzi C., Mozzon M., Cocolin L., Osimani A., Aquilanti L. (2021). Microbial communities and volatile profile of Queijo de Azeitão PDO cheese, a traditional Mediterranean thistle-curdled cheese from Portugal. *Food Research International*. 147(110537). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110537.

Cardoso V. M., Borelli B. M., Lara C. A., Soares M. A., Pataro C., Bodevan E. C. & Rosa C. A. (2015). The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Research International*, 69, 331-340, https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.040.

Castro R. D., Oliveira L. G., Sant'Ana F. M., Luiz L. M. P., Sandes S. H. C., Silva C. I., Silva A. M., Nunes A. C., Penna C. F. A. M. & Souza M. R. (2016). Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during dry and rainy seasons. *Journal of Dairy Science*, 99 (8), 1–11, https://doi.org/10.3168/jds.2015-10579.

Ceugniez A., Coucheney F., Jacques F., Daube G., Delcenserie V. & Djamel Drider D. (2017). Anti-Salmonella activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d'Orchies. *Research in Microbiology*, 168 (6), https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.03.004.

Costa Junior, L. C. G., Brasil, C. C. B., Carvalho, A. F., Santos, P. F., Ferreira, C. L. L. F., & Martins, J. M. (2009). Variações na composição de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra nas quatro estações do ano. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 64(371), 13–20.

Demirci, T. (2024). Highlighting the microbial community of Küflü cheese, an artisanal Turkish mold-ripened variety, by high-throughput sequencing. *Food Science and Animal Resources*, 44(2), 390-407. https://doi.org/10.5851/kosfa.2024.e59.

Demirel, R., Asan, A., Bayçu, C., Kınacı, E., & İlhan, S. (2005). Microfungi in cultivated fields in Eskişehir province (Turkey). *Journal of Basic Microbiology*, 45(4), 279-293. https://doi.org/10.1002/jobm.200410526.

Didienne, R., Defargues, C., Callon, C., Meylheuc, T., Hulin, S., & Montel, M.-C. (2012). Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology,* 156(2), 91-101. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.007.

Dobson A. D. W. (2017). Mycotoxins in Cheese, In: Eds. P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, P. Cotter, DW Everett, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 4th Edition, (pp. 595-601). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00023-5

Eliskases-Lechner, F., Guéguen, M., & Panoff, J.-M. (2011). Yeasts and molds | *Geotrichum candidum*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 765-771). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00365-4.

Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B., & Cosentino, S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT*, 75, 100-106. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.020

Furtado, M. M. (2019). Uso de madeira na maturação de queijos: uma tradição secular a ser respeitada. Guia Lat. https://www.guialat.com.br/?p=detalhar_noticia&id=4420. Acesso em 12 dez. 2024.

Haïssam J. M. (2011). *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. *Antonie Van Leeuwenhoek, 99*(1), 93-105. https://doi.org/10.1007/s10482-010-9541-2.

Hymery N., Vasseur V., Coton M., Mounier J., Jany J. L., Barbier G., & Coton E. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 437-456, https://doi.org/10.1111/1541-4337.12077.

Ide L. P. de A., & Benedet H. D. (2002). Contribution to the study of colonial cheese produced on highlands of Santa Catarina state, Brazil. *Ciência e Agrotecnologia*, 25, 1351-1358.

INMEP. Instituto Nacional de Meteorologia. (2024). *Tabela de dados das estações*. Disponível em: https://portal.inmet.gov.br/. Acesso em 10 dez. 2024.

Irlinger F., Layec S., Hélinck S., & Dugat-Bony E. (2015). Cheese rind microbial communities: Diversity, composition, and origin. *FEMS Microbiology Letters*, 362(2), 1-11, https://doi.org/10.1093/femsle/fnu015.

Jonnala B. R. Y., McSweeney P. L. H., Sheehan J. J., & Cotter P. D. (2018). Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-12, https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020.

Kamimura, B. A., Magnani, M., Luciano, W. A., Campagnollo, F. B., Silva, T. C., & Sant'Ana, A. S. (2019). Brazilian artisanal cheeses: An overview of their characteristics, main types, and

regulatory aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1636-1657, https://doi.org/10.1111/1541-4337.12486.

Kawtharani, H., Beaufort, S., Anson, P., Taillandier, P., Mathieu, F., & Snini, S. P. (2022). Impact of the inoculation method of *Geotrichum candidum*, used as biocontrol agent, on T-2 toxin produced by *Fusarium sporotrichioides* and *F. langsethiae* during the malting process. *Toxins* (Basel), 14(4), 239. https://doi.org/10.3390/toxins14040239.

Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. CBS.

Kothe, C. I., Mohellibi, N., & Renault, P. (2022). Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics. *Food Research International*, 157, 111265. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111265

Lacorte, G., Cruvinel, L., Ávila, M., Dias, M., Pereira, A., Nascimento, A., & Franco, B. (2022). Investigating the influence of Food Safety Management Systems (FSMS) on microbial diversity of Canastra cheeses and their processing environments. *Food Microbiology*, 105, 104023. https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104023

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Ames: Blackwell Publishing.

Li, X., Tang, H., Yang, C., Meng, X., & Liu, B. (2019). Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Control*, 96, 47-52. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.029.

Loureiro, S., Cavalcanti, M., Neves, R., & Passavante, J. (2005). Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4), 340-345. https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000400005.

Martin, J. G. P., & Cotter, P. D. (2023). Filamentous fungi in artisanal cheeses: A problem to be avoided or a market opportunity? *Heliyon*, 9(4), e15110. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15110

Martin, J. G. P., Silva, J. M. M., César, I. C. R., da Silva, M., Santana, S. A., Veloso, T. G. R., e Silva, J. G., Ferreira, C. L. L. F., Leech, J., & Cotter, P. D. (2023). Seasonal variation in the Canastra cheese mycobiota. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1076672. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1076672

Martins, J. M. (2006). *Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro* (Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa). Universidade Federal de Viçosa.

Martins, M. C. de F., de Freitas, R., Deuvaux, J. C., Eller, M. R., Nero, L. A., & de Carvalho, A. F. (2018). Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Food Research International*, 108, 295-300. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.060

McSweeney, P. L. H. (2007). *Cheese problems solved* (p. 388). Woodhead Publishing.

McSweeney, P. L. H., Ottogalli, G., & Fox, P. F. (2004). Diversity of cheese varieties: An overview. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (3rd ed., Vol. 2, pp. 1-23). Chapman & Hall.

McSweeney, T. P., & Fox, P. F. (2004). Salt in cheese: Physical, chemical and biological aspects. In P. F. Fox, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), Cheese: Chemistry, physics and microbiology (3rd ed., Vol. 1, pp. 1-2). Elsevier Academic Press.

Minas Gerais, Instituto Mineiro de Agropecuária. (2024). Portaria nº 2307, de 12 de junho de 2024. Estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo Minas artesanal de casca florida natural. Belo Horizonte: IMA.

Minas Gerais, Instituto Mineiro de Agropecuária. (2024). Portaria nº 2307, de 12 de junho de 2024. Estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo Minas artesanal de casca florida natural. Belo Horizonte: IMA.

Mitra, M., Venkatesh, P., Ghissing, U., Biswas, A., Mitra, A., Mandal, M., Mishra, H. N., & Maiti, M. K. (2023). Fruity-scented antifungal volatiles from endophytic *Geotrichum candidum* PF005: Broad-spectrum bioactivity against stored grain pathogens, mode of action, and suitable formulation for mycofumigation. *Biological Control*, 177, 105129. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105129.

Moreno, V. J. (2013). *Caracterização física e físico-química do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes* (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora). Universidade Federal de Juiz de Fora.

Mounier, J., Goerges, S., Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Brennan, N. M., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G. F., & Cogan, T. M. (2006). Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 668-681. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02922.x.

Nielsen, M. S., Frisvad, J. C., & Nielsen, P. V. (1998). Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2), 91-99. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00131-9.

Normand, A. C., Gabriel, F., Riat, A., Cassagne, C., Bourgeois, N., Huguenin, A., Chauvin, P., De Geyter, D., Bexkens, M. L., Rubio, E., Hendrickx, M., Ranque, S., & Piarroux, R. (2020). Optimization of MALDI-ToF mass spectrometry for yeast identification: A multicenter study. *Medical Mycology*, 58(5), 639-649. https://doi.org/10.1093/mmy/myz078.

Ouadghiri, M., Amar, M., Daniel, H.-M., Swings, J., & Vandamme, P. (2014). Yeasts in traditional Moroccan goat cheese. *African Journal of Microbiology Research*, 8(32), 3029-3037. https://doi.org/10.5897/AJMR2013.627.

Papadimitriou, K., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2015). How microbes adapt to a diversity of food niches. *Current Opinion in Food Science*, 2, 29-35. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.01.004.

Pereira, D. B. C., Silva, P. H. F., Costa Júnior, L. C. G., & Oliveira, L. L. (2001). *Físico-química do leite e derivados: Métodos analíticos* (2ª ed.). Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora.

Pereira G. V. M., Beux M., Pagnoncelli M.G., Soccol V. T., Rodrigues C. & Soccol C. R. (2016). Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, 62(1), 96-101. https://doi.org/10.1111/lam.12520. PMID: 26544541.

Pitt, J. I. (2000). A laboratory guide to common Penicillium species. Food Science Australia. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3579-3_24.

Prates, F. C. (2023). *Artisanal Minas cheese produced in the Campos das Vertentes/MG region: Microbiota and volatile compounds profile* (Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras). Universidade Federal de Lavras

Ritschard, J. S., & Schuppler, M. (2024). The microbial diversity on the surface of smear-ripened cheeses and its impact on cheese quality and safety. *Foods*, 13(2), 214. https://doi.org/10.3390/foods13020214.

Rocha, L. M. N. (2023). *Micobiota em queijo minas artesanal "casca florida" em diferentes tempos de maturação* (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras). Universidade Federal de Lavras.

R Core Team (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Samson, R. A., et al. (2010). *Food and indoor fungi* (CBS Laboratory Manual Series 2). CBS Fungal Biodiversity Centre.

Sant'Anna, F. M., Wetzels, S. U., Cicco, S. H. S., Figueiredo, R. C., Sales, G. A., Figueiredo, N. C., Nunes, C. A., Schmitz-Esser, S., Mann, E., Wagner, M., & Souza, M. R. (2019). Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. *Food Microbiology*, 82, 349–362. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.016.

Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Gomes, R. A. R., & Okazaki, M. M. (2017). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água* (5ª ed.). Blucher. ISBN 978-85-212-1225-6.

Sipiczki, M., & Hrabovszki, V. (2023). *Galactomyces candidus* diversity in the complex mycobiota of cow-milk bryndza cheese comprising antagonistic and sensitive strains. *International Journal of Food Microbiology*, 388, 110088. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110088.

Sørensen, L. M., Gori, K., Petersen, M. A., Jespersen, L., & Arneborg, N. (2011). Flavour compound production by *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii* in a cheese-surface model. *International Dairy Journal*, 21(12), 970–978.

Souza, T. P., Evangelista, S. R., Passamani, F. R. F., Bertechini, R., de Abreu, L. R., & Batista, L. R. (2021). Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. *International Dairy Journal*, 120, 105085. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105085.

Sun, L., & D'Amico, D. J. (2023). Characterization of microbial community assembly on new wooden vats for use in cheese production. *Food Microbiology*, 109, 104154. https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104154.

Thunyaharn, S., Sungsirin, N., Phoomee, C., Suvarnajata, A., Khamsaen, K., Matrakool, B., Saichanma, S., & Boonsiri, T. (2021). Airborne fungi in buildings of Nakhon Ratchasima College. *Progress in Applied Science and Technology*, 11(2), 1-5. https://doi.org/10.14456/past.2021.11.

UNESCO. (2024). *Traditional ways of making Artisan Minas Cheese in Minas Gerais*. Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura. Disponível em: https://ich.unesco.org/en/RL/traditional-ways-of-making-artisan-minas-cheese-in-minas-gerais-02102. Acesso em: 14 dez. 2024.

Valente G. L. C., Figueiredo R. C., Brito R. F., Lana Â. M. Q., Souza B. M. S. de, Fonseca L. M., Madureira A. P., Silva A. M., Andrade C. F., Penna M. & Souza M. R. de. (2024). Microbiological and physicochemical characterization of Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region (Brazil) during ripening in rainy and dry seasons. *Vigilância Sanitária Em Debate*, 12, 1-6, https://doi.org/10.22239/2317-269X.02357.

Yang, Q., Wang, J., Zhang, H., Li, C., & Zhang, X. (2016). Ochratoxin A is degraded by *Yarrowia lipolytica* and generates non-toxic degradation products. *World Mycotoxin Journal*, 9(2), 269–278.

Zhang, X., Li, Y., Wang, H., Gu, X., Zheng, X., Wang, Y., Diao, J., Peng, Y., & Zhang, H. (2016). Screening and identification of novel ochratoxin A-producing fungi from grapes. *Toxins* (Basel), 8(11), 333. https://doi.org/10.3390/toxins8110333.

ARTIGO 2 – Validação de método multianalito baseado em "dilute in shoot" para determinação de ocratoxina A e aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) em Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural por UPLC-MS/MS

Formatado de acordo com as diretrizes do Food Analytical Methods
ISSN: 1936-976X
(versão preliminar)

Fabiana Regina Lima[1], Elisângela Jaqueline Magalhães[2], Fabiana Franca Reinis Passamani[1], Rafael von Sperling de Souza[3], Fabiano Narciso Paschoal[3], Raquel Eduardo Bickel[3], Mariana de Oliveira Almeida[3], Luís Roberto Batista[1*]

[1]Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos. Caixa Postal 3037 - CEP: 37203-202, Lavras, MG - Brasil.
[2]Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos. Caixa Postal 3037 - CEP: 37203-202, Lavras, MG - Brasil.
[3]Laboratório de Micotoxinas, Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira - CEP: 30510-010, Belo Horizonte, MG - Brasil

Resumo

Os queijos artesanais são amplamente valorizados no Brasil, sendo o estado de Minas Gerais destaque na produção dos renomados Queijos Minas Artesanais (QMA), cujo modo de produção é reconhecido como Patrimônio Imaterial da Humanidade. O queijo Minas artesanal de casca florida natural (QMACFN) é caracterizado pela dominância de fungo branco em sua superfície. A ocorrência de micotoxinas em queijos artesanais é bem documentada mundialmente, mas a escassez de informações sobre produtos nacionais e a ausência de limites regulatórios ainda é significativa. O objetivo deste trabalho foi validar um método multianalito para a determinação simultânea de ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1 em QMACFN por UPLC-MS/MS. O método apresentou boa linearidade para curvas usuais e matrizadas, com coeficientes de determinação maior que 0,99 para todos os analitos. Os valores de recuperação variaram de 87,89% a 109,01% com desvios padrão relativos menores que 14%, atendendo aos critérios recomendados pela Comissão Européia (EC). Os limites de detecção variaram de 0,07 a 0,40 µg/kg, com limites de quantificação entre 0,76 e 1,9 µg/kg. O método validado foi aplicado a 30 amostras de QMACFN, coletadas em diferentes regiões produtoras do estado. Contudo, nenhuma das micotoxinas investigadas foi detectada. Esses resultados destacam a importância da atenção dos produtores às boas práticas agropecuárias e de fabricação como o controle ambiental durante o processo de maturação. Este estudo contribui para o desenvolvimento de ferramentas confiáveis para detectar micotoxinas, garantindo a segurança alimentar e apoiando a criação de limites regulatórios para estes contaminantes em queijos artesanais maturados por fungos.

Palavras-chaves: Queijos artesanais; Fungos; Micotoxinas; Validação de métodos; UHPLC-M/MS.

*Autor correspondente

Luís Roberto Batista, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos. Caixa Postal 3037 - CEP: 37203-202, Lavras, MG - Brasil.

Telefone: (+55) 35 3829-1407

E-mail: luisrb@ufla.br

Introdução

As micotoxinas constituem um grupo diversificado de substâncias tóxicas que são produzidas como metabólitos secundários por determinados fungos. Esses compostos representam um problema significativo de segurança alimentar em escala global estando entre os tóxicos naturais de maior preocupação para a saúde pública, devido à sua ampla distribuição em rações e alimentos, e aos graves efeitos adversos à saúde que podem causar em humanos e animais, como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e carcinogênese (Benkerroum 2016).

As aflatoxinas e a ocratoxina destacam-se como as micotoxinas mais amplamente disseminadas na natureza, sendo também as que apresentam maior preocupação em relação à saúde (Braga et al. 2023). De acordo com Hymery e colaboradores (2014), no queijo, as micotoxinas mais perigosas são ocratoxina A (OTA) e aflatoxina M1 (AFM1). Elas são, respectivamente, produzidas por espécies de fungos indesejáveis por contaminação direta do queijo durante processo de produção e maturação ou contaminação indireta do leite usado para a fabricação de queijo devido à contaminação da ração.

O estado de Minas Gerais, Brasil, se destaca como o principal estado produtor de queijos artesanais no país, abrangendo microrregiões certificadas como produtoras dos renomados Queijos Minas Artesanais (QMA), que são valorizados por sua qualidade, sabor característico e forte ligação com as tradições culturais de diversas microrregiões do estado, sendo seu processo de produção reconhecido como Patrimônio Imaterial da Humanidade (UNESCO, 2024). Dentre os QMA, o queijo Minas artesanal de casca florida natural (QMACFN), recentemente regulamentado no estado, é caracterizado pela presença e dominância de fungo branco em sua superfície, que se desenvolvem durante o período de maturação (Minas Gerais 2024).

Por ser produzido e maturado de forma artesanal, o QMACFN está suscetível à ação de diferentes microrganismos provenientes do ambiente e da matéria-prima. Embora os fungos possam desempenhar papéis importantes no desenvolvimento do sabor e aroma característicos dos queijos artesanais maturados, devido ao envolvimento destes microrganismos com a degradação de lipídios e proteínas, e também o controle sobre o desenvolvimento de espécies patogênicas, a possível presença de espécies toxigênicas exige um equilíbrio cuidadoso durante o processo de produção e maturação (Martin e Cotter 2023).

A ocorrência de espécies fúngicas toxigênicas bem como de micotoxinas em queijos maturados por fungos de diferentes países tem sido relatadas. Souza et al. (2020) observou a presença de espécie potencialmente toxigênica, a citar *Aspergillus flavus*, produtora de aflatoxinas B1 (AFB1) e B2 (AFB2) nas amostras de QMACFN da microrregião do Serro, Brasil. Marcelão et al. (2024) ao avaliarem queijos artesanais produzidos no estado de Minas Gerais e São Paulo, relataram a presença de espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* e detecção de OTA em 22% das amostras analisadas. Skrbic et al. (2015), ao avaliar a presença de AFM1 em queijos de mofo branco produzidos na Sérbia, observou que 54% das amostras de queijo analisadas estavam contaminadas em concentrações que variaram de 0,08 a 2,23 μg/kg.

O monitoramento contínuo de micotoxinas em queijos artesanais maturados é fundamental para garantir a qualidade e a segurança alimentar, devido aos riscos associados a esses compostos. Para minimizar estes riscos faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis para a detecção e quantificação de micotoxinas nos queijos, assegurando precisão nas análises e contribuindo para segurança do produto e adoção de medidas preventivas necessárias. Neste contexto, Cañás et al. (2023) enfatiza que, o alto teor de gordura e proteína do queijo e a diversidade química de micotoxinas que podem aparecer neste produto tornam o desenvolvimento

de procedimentos analíticos desafiadores, sendo que, de fato, atualmente estão disponíveis poucos métodos para extração e quantificação de micotoxinas em queijos.

Diferentes abordagens analíticas têm sido aplicadas na determinação de micotoxinas em alimentos, com grande destaque para a técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) acoplada à espectrometria de massas sequencial (MS/MS), se tornando referência para a análise de diversos contaminantes em alimentos (Medina et al. 2019; Mateus et al. 2021; Mudannayake et al. 2024). Essa metodologia permite a identificação e quantificação simultânea de múltiplos analitos em baixas concentrações, de maneira precisa e em um tempo reduzido (Rodríguez et al. 2017). Associada a essa técnica, metodologias de extração sem etapa de *clean-up*, como o *dilute and shoot*, têm sido cada vez mais utilizadas, pois proporcionam resultados rápidos e eficazes, além de reduzir o consumo de solventes e o tempo necessário para o preparo das amostras (Malachova et al. 2018).

No Brasil, a AFM1, é a única micotoxina para a qual foram estabelecidos limites máximos tolerados em queijos de uma forma geral (2,5 μg/kg) (BRASIL 2022). Embora existam relatos sobre a presença de micotoxinas em queijos artesanais maturados, ainda não existem limites toleráveis definidos por regulamentações específicas, reforçando a necessidade de monitoramento contínuo para estabelecer tais parâmetros. Este trabalho teve como objetivo validar um método multianalito baseado em técnica "*dilute and shoot*" para a determinação simultânea de ocratoxina A e aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) em QMACFN por UPLC-MS/MS.

Material e métodos

Reagentes e soluções

Acetonitrila e metanol (grau HPLC) foram adquiridos da J.T. Baker (Center Valley, PA, EUA). Ácido fórmico (pureza >98%) e formiato de amônio (pureza >99%) foram obtidos da Merck (Kenilworth, NJ, EUA). Água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha). Os padrões de AFB1, AFB2, aflatoxina G1 (AFG1), aflatoxina G2 (AFG2), AFM1 e OTA foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Soluções estoque padrão de aproximadamente 10 μg/mL foram preparadas para AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1 e de aproximadamente 40 μg/mL para OTA. Alíquotas de soluções padrão individuais de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 foram diluídas com metanol, resultando em uma solução intermediária combinada com concentração de 1,01 μg/mL para AFB1, 0,998 μg/mL para AFB2 e AFG1, e 1,005 μg/mL para AFG2. Para obtenção das soluções intermediárias contendo AFM1 e OTA, as diluições foram realizadas com acetonitrila e tolueno-ácido acético (99:1 v/v), respectivamente, para obter soluções com concentração de 1,004 μg/mL para cada analito. Todas as soluções foram armazenadas em freezer a -25 ºC.

Metodologia Analítica

Ensaios preliminares

As condições analíticas para o método UPLC-MS/MS foram baseadas em um procedimento recentemente descrito para determinação de multimicotoxinas em embutidos cárneos fermentados (Braga et al. 2023). Considerando que a presença de AFM1 vem sendo frequentemente relatada em queijos (Mudannayake et al. 2024; Skrbic et al. 2015; Silva et al. 2023), como também o fato de ser a única micotoxina presente na legislação nacional para queijos (Brasil 2022), a mesma foi incluída na metodologia como analito de interesse, além da OTA e das aflatoxinas, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2.

Com o objetivo de se obter a máxima eficiência de extração para todos os analitos investigados, modificações na metodologia sugerida por Braga et al. (2023) foram avaliadas, como a inclusão de etapas envolvendo a adição de hexano como agente desengordurante, a acidificação da fase extratora e também a evaporação do extrato com posterior retomada em solvente apropriado. A eficácia dos ensaios preliminares foi avaliada de acordo com a porcentagem de recuperação do respectivo analito.

Amostras brancas de Queijo Minas Artesanal, obtidas no comércio local, foram previamente investigadas, mostrando-se livres das micotoxinas consideradas nos níveis detectáveis por este estudo. As amostras brancas foram enriquecidas em triplicata com 5 µg/kg de OTA, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 e 2 µg/kg de AFM1, mantidas *overnight*, e analisadas de acordo com a metodologia proposta.

Preparo da amostra

Amostras constituídas de pontos equidistantes de um queijo inteiro, compreendendo casca e massa, foram raladas finamente em ralador de alimentos e alíquotas de 5 g destas amostras foram colocadas em um tubo cônico para centrífuga do tipo Falcon de 50 mL de capacidade, juntamente com 20 mL de solução de extração. Duas soluções extratoras foram testadas, metanol:acetonitrila:água (60:20:20, v/v/v) e acetonitrila:água (80:20, v/v) (Paschoal et al. 2017; Braga et al. 2023).

Os tubos contendo a amostra e as soluções extratoras foram agitadas por 30 minutos em um agitador tipo *multi-wrist* (Lab-line™, Cairo, Egito), sendo, em seguida, centrifugados (Jouan BR4i, Saint-Herblain, França) a aproximadamente 2.500 g, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi transferida para um frasco de vidro âmbar e evaporada à 50 ºC sob fluxo de nitrogênio. Posteriormente, o extrato seco foi então reconstituído com 1 mL de metanol:água (1:1, v/v). Após agitação em vórtex, por 2 minutos, o extrato (1 mL) foi transferido para um tubo para centrifuga do tipo Eppendorf, de 2 mL de capacidade, e novamente centrifugado a aproximadamente 19.700g, por 10 minutos, a 4°C. Antes da injeção no sistema UPLC-MS/MS todos os extratos foram filtrados através de um filtro de seringa com membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e porosidade de 0,22 µm (GE UnifloTM-Whatman, Amersham, Reino Unido).

Condições Instrumentais do UPLC-MS/MS

As análises foram realizadas em um sistema UPLC Acquity I-Class acoplado a um detector de espectrometria de massas quadrupolo sequencial Xevo-TQ-S (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). A coluna empregada foi de fase reversa (Acquity UPLC BEH, Waters, Massachusetts, EUA), 130 Å, 1,7 µm, 2,1 × 100 mm. O desempenho aprimorado na separação cromatográfica das seis micotoxinas foi possível usando duas fases móveis: (A) - composta de solução aquosa de ácido fórmico 0,01% e formiato de amônio 5 mM e (B) - composta de metanol com ácido fórmico 0,01% e formiato de amônio 5 mM. O fluxo das fases móveis foi de 0,3 mL/min, e uma eluição em gradiente de 10 min de duração foi otimizada: o gradiente se iniciou com 20% da fase móvel B com aumento da concentração até a proporção de 70% em 5 min. No próximo minuto foi atingida a proporção de 90% de solvente orgânico que foi mantida até o oitavo minuto da corrida para limpeza do sistema. Na faixa de 8 a 10 minutos, a fase móvel B foi reduzida para 20%, retornando à condição inicial do gradiente para estabilização. O volume de injeção foi de 5 µL.

A detecção por espectrometria de massas foi realizada por ionização por eletrospray no modo positivo (ESI+) usando Monitoramento de Reação Múltipla (MRM). As condições de operação foram as seguintes: a tensão

capilar aplicada ao eletrospray foi de 3,5 kV; a temperatura da fonte foi de 150 °C e a pressão do gás nebulizador (nitrogênio) foi de 7,0 bar; a temperatura de dessolvatação foi de 600 °C, o fluxo do gás de dessolvatação (nitrogênio) foi de 1200 L/h e o fluxo do gás cone de 150 L/h. Argônio foi usado como gás de colisão em um fluxo de 0,17 mL/min.

Os parâmetros de aquisição do espectrômetro de massas para cada analito de interesse foram determinados por meio da injeção individual de solução padrão diretamente no espectrômetro de massa. A aquisição dos dados foi previamente investigada por varredura completa para determinar os íons precursores de cada analito. Em seguida, as condições de fragmentação MS/MS foram investigadas, sendo dois íons fragmentos mais abundantes no espectro selecionados para detecção, um deles empregado para a quantificação e o outro para a confirmação do analito. A voltagem do cone (CV), energia de colisão (CE) e transições de massas foram otimizadas para cada micotoxina e estão dispostos na tabela S1 dos materiais suplementares.

Validação do método

Para verificar a adequação da metodologia na determinação das seis micotoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 e OTA) no queijo QMACFN, as seguintes figuras de mérito foram avaliadas: seletividade, linearidade, efeito de matriz, exatidão, precisão sob condições de repetibilidade e precisão intermediária e limites de detecção e quantificação. O desempenho do método foi avaliado segundo os critérios estabelecidos pelo Regulamento de Execução (EU) 2023/2782 da Comissão (EC 2023) e pelo Manual da Garantia da Qualidade Analítica (Brasil, 2015).

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pelo perfil do cromatograma obtido da análise de amostras de matriz branca de queijo Minas artesanal, como também de amostras brancas fortificadas com as micotoxinas. Procurou-se observar a ausência de picos interferentes que poderiam impactar a detecção dos analitos dentro das faixas de tempo de retenção das micotoxinas.

Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por ensaios com curvas de analíticas construídas em solvente e em extrato do branco da matriz de queijo Minas artesanal. Para a elaboração das curvas analíticas, solução intermediária do *pool* de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA e AFM1 foi empregada para obtenção de solução de trabalho contendo todas as seis micotoxinas. Alíquotas de 40 dessa solução foram introduzidas em frasco, protegido da luz, e o solvente foi evaporado sob leve fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente, até secura. O resíduo foi ressuspenso em 5 mL do extrato de queijo (curva matrizada) ou em metanol:água (50:50, v/v) (curva analítica em solvente). Três replicatas foram preparadas por nível de concentração e analisadas em ordem aleatória.

Os níveis de concentração das curvas analíticas estão descritos na tabela 1, tendo sido estabelecidos com base na legislação para a determinação de AFM1 em queijos (Brasil 2022). Também foram considerados os limites máximos estabelecidos para as demais micotoxinas estudadas em outras matrizes, visto a falta de regulamentos nacionais e internacionais que definam tais limites para essas substâncias em queijos.

Tabela 1 Concentrações de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1 e OTA utilizadas na construção das curvas analíticas.

Micotoxinas	Concentração (ng/mL)					
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6
Aflatoxina B1	0,121	0,242	0,364	0,485	0,606	0,727
Aflatoxina B2	0,120	0,240	0,359	0,479	0,599	0,719
Aflatoxina G1	0,120	0,239	0,359	0,479	0,599	0,718
Aflatoxina G2	0,121	0,241	0,362	0,482	0,603	0,723
Aflatoxina M1	0,048	0,096	0,145	0,193	0,241	0,298
Ocratoxina A	0,120	0,241	0,361	0,482	0,602	0,723

Os parâmetros das curvas analíticas foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, sendo verificadas as premissas de normalidade (teste de Ryane Joiner), homoscedasticidade (teste de Brown e Forsythe), independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin e Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (ANOVA). *Outliers* foram investigados pelo teste de Jacknife.

Efeito de Matriz

Para avaliação do efeito de matriz, duas curvas analíticas foram preparadas segundo os procedimentos anteriormente descritos, sendo uma em solvente e outra em extrato da matriz. A interferência da matriz foi avaliada comparando as inclinações e os interceptos das curvas analíticas preparadas em solvente com aquelas preparadas em extrato da matriz, utilizando o Teste T de *Student* para a análise estatística (Souza et al. 2007).

Exatidão e Precisão

Exatidão e precisão foram avaliadas por ensaios de adição e recuperação. Para isso, a fortificação em amostra branca foi realizada em três níveis de concentração, 2, 6 e 11 µg/kg para AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA e 0,90, 3,01, 4,41 µg/kg para AFM1 (Tabela 4), realizada em 5 replicatas independentes. A repetibilidade foi executada no mesmo dia, pelo mesmo analista. Para estimar a precisão intermediária, as análises foram realizadas em outro dia, por mais um analista, totalizando 10 replicatas para cada nível de concentração (Brasil, 2015). As porcentagens médias de recuperação foram obtidas para cada nível de concentração, após interpolação de cada resposta do analito na correspondente curva de calibração, comparando a concentração das micotoxinas obtidas pelo método previamente otimizado com a concentração na matriz fortificada. As porcentagens médias de recuperação obtidas para cada nível de concentração foram comparadas com os critérios de aceitação estabelecidos, sendo considerados satisfatórios quando situados no intervalo de 70% a 120% (CE 2023). Os resultados foram submetidos à análise de variância para estimar os desvios-padrão relativos (RSD) sob condições de repetibilidade e precisão intermediária. O método foi considerado preciso quando tais valores mostraram-se inferiores a 20% para todos os analitos investigados (CE, 2023).

Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) teóricos foram calculados através dos resultados das curvas de analíticas matrizadas, sendo definidos como sendo, respectivamente, três e dez vezes o desvio padrão do intercepto dividido pela inclinação das curvas.

Ocorrência de micotoxinas em amostras reais de QMACFN

Um total de 30 amostras de QMACFN, com, em média 22 dias de maturação, foram coletadas em quatro regiões produtoras certificadas no estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2020 e 2024. As amostras foram provenientes de 12 queijarias distribuídas nas regiões de Diamantina (n=12), Campo das Vertentes (n=12), Canastra (n=4) e Cerrado (n=2). As amostras foram transferidas para sacos plásticos estéreis, transportadas sob refrigeração em caixas térmicas com gelo reutilizável e armazenadas no laboratório à -20 ºC até realização das análises.

Resultados e discussão

Desenvolvimento do método analítico

Os queijos são amostras muito complexas com características particulares, como alto teor de gordura e proteína que podem interferir na intensidade do sinal analítico gerado pela micotoxina alvo. Por tratar-se de um método multianalito com proposta de *clean-up* zero, uma abordagem aprimorada em relação ao preparo da amostra se faz necessária para se obter eficiência na determinação de todos os analitos investigados (Hamed et al. 2017). Levando isso em consideração, ensaios preliminares, em triplicata, foram realizados com amostras brancas fortificadas, para verificar a recuperação dos analitos e a necessidade de aprimoramento da metodologia.

Inicialmente, a fase extratora contendo metanol:acetonitrila:água (60:20:20, v/v/v) foi investigada. Entretanto, a OTA apresentou baixo valor de recuperação (66,53%), não atendendo o critério de 70 a 120%, estabelecidos pela EC (2023), o que levou a modificações no método de extração original visando melhorar o desempenho analítico. Nesse sentido, a adição de hexano como agente desengordurante do extrato de queijo foi testada, porém não resultou em melhorias nas recuperações das micotoxinas. Em particular, a recuperação da OTA permaneceu insatisfatória, atingindo apenas 62,06%, valor inferior ao critério de aceitabilidade estabelecido. Esse resultado pode ser atribuído à natureza lipofílica da OTA, podendo se associar à fase lipídica em vez de ser completamente transferida para a fase extratora, reduzindo a sua disponibilidade para detecção e quantificação (Su et al. 2024). Observações semelhantes foram reportadas por Braga et al. (2023) e Biancardi et al. (2013) ao avaliarem amostras de salsichas fermentadas e queijos duros, respectivamente.

A acidificação da solução extratora com 1% de ácido acético foi investigada, mas também não demostrou melhora na eficiência da extração da OTA, que apresentou 67,57% de recuperação, valor inferior ao esperado. Além disso, a solução acidificada levou à obtenção de recuperações acima de 100%, ou seja, aumentou o erro experimental (135,77%) para AFB1. O ambiente ácido pode promover a protonação de grupos funcionais ou minimizar interações adversas, facilitando a liberação das micotoxinas para a fase extratora, mas, alguns estudos mostram que a estratégia de acidificação da solução extratora nem sempre resulta em uma melhoria significativa na extração de micotoxinas, a depender da matriz alimentar, natureza e concentração das micotoxinas e o tipo de ácidos utilizados (Beltran et al. 2009; Huang et al. 2014).

Diante do desafio de melhorar a eficiência da extração de OTA dentro dos critérios de aceitabilidade, avaliou-se o uso de solução extratora composta por acetonitrila:água (80:20, v/v). Existem relatos evidenciando que OTA possui alta afinidade pelos componentes da matriz, como proteínas e lipídeos, o que interfere em sua extração e pode resultar em baixas taxas de recuperação em matrizes complexas como o leite, plasma e urina (Zöllner e Mayer-Helm 2006). A acetonitrila tem sido aplicada em protocolos de extração devido a sua habilidade de extrair analitos com diferentes polaridades, redução de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, além

de sua capacidade de precipitar proteínas, o que pode ser particularmente relevante em análises de produtos lácteos, resultando em extratos mais limpos e com menos interferentes (Abreu et al. 2020; Mateus et al.,2021; Musliu et al.,2022; Wang et al.,2011).

Os resultados das recuperações obtidos utilizando fase extratora contendo acetonitrila, variaram de 86,27% para OTA a 104,23% para AFB1, evidenciando a melhor adequação desta fase extratora para a metodologia proposta. Esses resultados corroboram com outros autores, que também relataram maiores porcentagens de recuperação de OTA em leite, cereais, cerveja e outras matrizes, quando extraídas com acetonitrila, em comparação ao metanol (Huang et al. 2014, Beltrán et al. 2009; González-Jartín et al. 2018, Nakhjavan et al. 2020). Desta forma, o procedimento de preparo da amostra aplicando solução extratora composta por acetonitrila:água (80:20, v/v) favoreceu a adequação da metodologia ao objetivo proposto, garantindo um método simples, rápido e econômico, com sensibilidade e precisão analítica satisfatórios, e atendimento aos critérios de aceitabilidade da EC (2023).

Efeitos positivos da evaporação do solvente com posterior reconstituição do resíduo em solvente compatível com a fase móvel foram relatados por Nakhjavan et al. (2020). Nesse sentido, buscando garantir a compatibilidade do solvente do extrato com as fases móveis, uma etapa de evaporação com posterior reconstituição do extrato em metanol:água (50:50, v/v) foi adicionada ao preparo da amostra. Essa etapa levou a uma melhor conformação dos sinais cromatográficos e melhor resposta analítica.

Condições do UPLC-MS/MS

A separação cromatográfica utilizando fases móveis compostas por água e acetonitrila, ambas acidificadas com 0,2% de ácido fórmico (Braga et al. 2023) foi avaliada. No entanto, os parâmetros de separação não se mostraram satisfatórios para o atender as premissas de linearidade para a AFM1, comprometendo também a obtenção de baixos limites de quantificação para AFM1 e AFG2, que se mostraram acima do menor nível de concentração faixa linear da curva analítica, estreitando a capacidade de quantificação destes analitos pelo método proposto.

O uso de fases móveis compostas por metanol, água, ácido fórmico e formiato de amônio para determinação de micotoxinas por UPLC-MS/MS é bem relatado na literatura (Cañás et al. 2023; González-Jartín et al. 2018; Panara et al. 2022; González-Jartín et al. 2021; Abreu et al. 2020). Cañás et al. (2023) afirmam que fases móveis compostas por metanol apresentam melhores resultados comparado às fases móveis compostas por acetonitrila, em termos de sensibilidade na determinação das micotoxinas, como também observou que o uso de formiato de amônio combinado ao ácido fórmico levou ao aumento nos sinais dos analitos. Son et al. (2020) reforçam que o formiato de amônio tem maior solubilidade no metanol comparado à acetonitrila, recomendando o uso deste solvente como fase móvel, concomitantemente com fase aquosa de solução tampão, composta por formiato de amônio e ácido fórmico, que pode favorecer a ionização e, consequentemente, aprimorar a sensibilidade e capacidade de detecção das micotoxinas pelo detector de espectrometria de massas. Cañás et al. (2023) e Panara et al. (2022) analisaram micotoxinas em produtos lácteos e o uso de fases móveis compostas por água e metanol adicionados de 0,01% ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio favoreceram a separação, com boa resolução de pico e alta intensidade de sinal para os analitos investigados. Assim, uma nova fase móvel, composta por (A) - solução aquosa de ácido fórmico 0,01% e formiato de amônio 5 mM e (B) - metanol com ácido fórmico 0,01% e formiato de amônio 5 mM, com novo gradiente, foram avaliados, permitindo a obtenção de

melhor intensidade nos sinais analíticos, com melhores resoluções de picos e sensibilidade para todas micotoxinas estudadas, além da redução 15 para 10 minutos no tempo total da análise.

Validação do método

A ausência de sinais interferentes no tempo de retenção dos analitos, no cromatograma obtido da análise da amostra em branco foi observada, demonstrando a seletividade do método proposto. Para amostras fortificadas com as micotoxinas avaliadas neste estudo, também não foram observados sinais de interferência eluindo no mesmo tempo de retenção das micotoxinas. A Figura 1 exibe um cromatograma obtido da análise de uma amostra branca de QMA fortificada com as micotoxinas na concentração de 11 µg/kg de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA, e 4,41 µg/kg de AFM1.

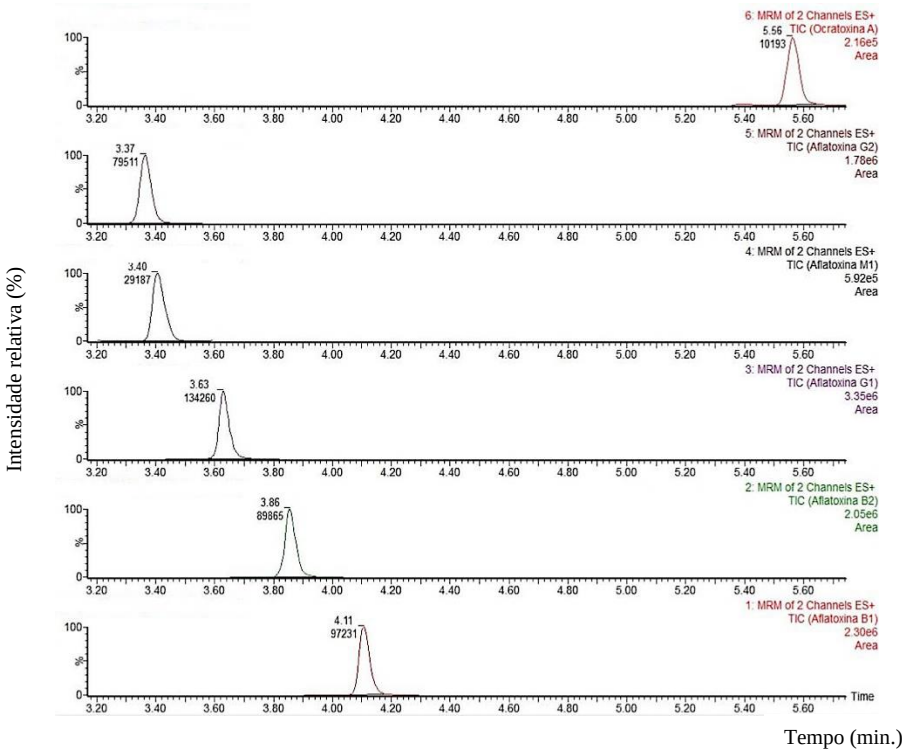


Figura 1 Cromatograma obtido da análise de uma amostra branca de QMA fortificada com 11 µg/kg de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA, e 4,41 µg/kg de AFM1.

Vale ressaltar que a seletividade do método foi garantida pelo eficiente método de extração, previamente otimizado, combinado com o uso do modo de aquisição por MRM, na detecção por espectrometria de massas, que empregou duas transições, uma para a quantificação e o outro para a confirmação de cada uma das micotoxinas. Nesse sentido, ainda que as aflatoxinas AFG2 e AFM1 tenham coeluído, a separação é garantida pelas transições específicas de cada analito, eliminando assim qualquer possibilidade de interferência no método proposto.

O método proposto demonstrou linearidade para todas as micotoxinas nas faixas de concentração estudadas, tanto para as curvas usuais, construídas em solvente, quanto para curvas construídas no extrato da matriz, confirmando todas as premissas do modelo de regressão linear. Os *outliers* detectados ficaram abaixo do limite recomendado de 20% dos dados originais, sugerindo que os valores discrepantes foram bem controlados no método aplicado assegurando confiabilidade do modelo. Foram confirmados para todos os analitos investigados a

normalidade (p>0,10) e a independência dos resíduos (p>0,05). A variabilidade dos resíduos mostrou-se homogênea (p>0,05) para todos os analitos ao longo de todas as faixas de concentração analisadas. Regressão significativa (p<0,05) e falta de ajuste não significativa (valores de p>0,05) foram encontradas, indicando que o modelo linear é adequado para todos analitos estudados. Os coeficientes de determinação para todas as curvas foram maiores que 0,99. Os parâmetros obtidos no teste de linearidade são mostrados na Tabela S2 (Material suplementar).

Diferenças significativas (p<0,05) entre as inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente e em extrato da matriz para a maioria das micotoxinas investigadas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA) foram observadas (Tabela 2). Em relação às interseções das curvas analíticas preparadas em solvente e em matriz foram observados efeitos de matriz (p<0,05) apenas para AFB2 e AFG1. AFM1 não mostrou efeito de matriz (p>0,05) em nenhum dos casos. Considerando esses resultados, a quantificação das micotoxinas foi realizada usando curvas construídas em matriz aplicadas nas etapas de validação subsequentes, assegurando que a resposta analítica refletisse as condições reais da amostra, como também nas análises para verificar a ocorrência dos analitos em amostras reais de QMACFN. Uma comparação entre os parâmetros das curvas de calibração construídas em solvente e em extrato da matriz, foi relatada por Sartori et al. (2015) em derivados lácteos. Os autores relataram a existência de efeitos de matriz para maioria das micotoxinas investigadas e adoção de curvas matrizadas para a determinação dos analitos.

Tabela 2 Avaliação do efeito de matriz pelas comparações entre parâmetros das curvas construídas matrizadas com as curvas em solvente para cada micotoxina.

Micotoxinas	Interseções		$t_{crítico}$	Inclinações	
	t	p		t	p
Aflatoxina B1	0,57	0,57	2,03	**86,95**	**0,00**
Aflatoxina B2	**3,75**	**0,00**	2,11	**91,43**	**0,00**
Aflatoxina G1	**2,83**	**0,00**	2,07	**140,43**	**0,00**
Aflatoxina G2	1,14	0,26	2,07	**32,39**	**0,00**
Ocratoxina A	1,42	0,17	2,10	**12,97**	**0,00**
Aflatoxina M1	0,27	0,78	2,14	0,83	0,41

Casos em que o efeito matriz foi confirmado estão destacados em negrito; p valor: significância; t: estatística para comparações das interseções e inclinações das curvas em solvente e em matriz.

Os dados obtidos dos ensaios de exatidão e de precisão, tanto em condições de repetibilidade (RSD_r) quanto de precisão intermediária (RSD_R) são apresentados na Tabela 3. Os valores de recuperação variaram de 87,89% (OTA) a 109,01% (AFG1) estando de acordo com o critério de aceitabilidade, cuja faixa é de 70 até 120% (EC 2023), para todos os analitos. Os resultados obtidos nos ensaios de precisão, com RSD_r menor que 10,09% e RSD_R menor que 14,04% para todas as micotoxinas investigadas também atenderam aos critérios de aceitabilidade, mostrando-se inferiores a 20% (EC 2023), demostrado a confiabilidade e a consistência do método proposto.

Tabela 3 Resultados obtidos nos ensaios de precisão e exatidão do método, em três níveis de concentração, para cada analito.

			2 µg/kg			**6 µg/kg**			**11 µg/kg**		
Micotoxinas	LD	LQ	Rec.	RSD_r	RSD_R	Rec.	DPRr	DPRR	Rec.	RSD_r	RSD_R
Aflatoxina B1	0,13	1,93	101,34	5,12	5,12	106,93	1,96	2,43	101,77	2,44	2,99
Aflatoxina B2	0,07	1,92	96,55	5,72	5,72	105,21	2,05	2,05	100,46	2,26	5,19
Aflatoxina G1	0,36	1,92	102,70	4,55	5,90	109,01	2,11	2,18	105,90	2,63	3,21
Aflatoxina G2	0,40	1,93	101,74	7,26	14,04	106,05	2,19	4,98	102,31	2,73	7,48
Ocratoxina A	0,08	1,92	90,53	4,41	12,17	91,11	3,81	3,81	87,89	4,90	4,90
			0,90 µg/kg			**3,01 µg/kg**			**4,41 µg/kg**		
Aflatoxina M1	0,20	0,76	94,61	10,09	12,81	104,70	4,23	4,23	98,52	5,64	5,64

LD: Limite de detecção (µg/kg); LQ: Limite de quantificação (µg/kg); Rec. (%): recuperação; RSD_r (%) e RSD_R (%): Desvio padrão relativo em condições de repetibilidade e de precisão intermediária (n=5), respectivamente.

Cañás et al. (2023), ao avaliarem desenvolvimento de método de extração baseado em QuEChERS e quantificação por UPLC-MS/MS para diferentes micotoxinas em queijos, como Emmental, Brie e Camembert, relataram recuperações que variaram de 67,21 à 93,71% para AFB1, 71,42% à 79,19% para AFB2, 70,10% à 102,40% para AFG1, 81,17% à 94,12% para AFG2, 86,99 à 102,24% para AFM1 e 103,15% à 111,26% para OTA. Ainda no referido trabalho, os resultados dos ensaios de precisão apresentaram valores máximos de 15% de RSD_r e de 24% de RSD_R para as micotoxinas investigadas. Sartori et al. (2015) ao avaliar a exatidão e a precisão de um método para análise de aflatoxinas e ocratoxina A em leite UHT e em pó, apenas em condições de repetibilidade, observaram recuperações que variaram de 72 a 121%, com RSD_r menor que 17%, para os analitos investigados. Verifica-se por esses resultados que método proposto pelo presente estudo se mostrou superior aos métodos desenvolvidos pelos autores supracitados. O método baseado em *dilute and shoot*, além de ser considerado pioneiro no campo de determinação de multimicotoxinas (Sulyok et al. 2006), consistiu em método rápido, simples, sem necessidade de *clean-up*, tornando a sua aplicação prática e economicamente viável para a finalidade proposta.

Após a verificação do desempenho do método analítico, os Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) foram determinados (Tabela 3). Os valores de LD variaram de 0,07 µg/kg para AFB2 a 0,40 µg/kg para AFG2. Ao se avaliar os valores teóricos obtidos para os limites de quantificação, calculados a partir da razão entre o desvio padrão da inclinação e o intercepto, observou-se que os mesmos estavam abaixo das faixas lineares concentração validada. Diante disso, assumiu-se os limites de quantificação do método como sendo a concentração, em µg/kg, correspondente ao primeiro nível de concentração das curvas analíticas de cada micotoxina (Paschoal et al. 2017). Os valores de LQ para cada micotoxina nos QMACFN variaram de 0,76 µg/kg para AFM1 até aproximadamente 1,9 µg/kg para AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA. Resultados semelhantes foram determinados para AFM1 (LD de 0,3 µg/kg e LQ de 0,6 µg/kg), por Kokkonen et al. (2005), ao avaliarem diferentes maturados por fungos. Outros analitos (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA) investigados pelos mesmos autores apresentaram LD de 0,3 µg/kg e LQ de 5 µg/kg para OTA, para as aflatoxinas, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, o LD foi de 0,8 µg/kg e LQ foi 5 µg/kg.

Baixos valores de LQ para OTA foram observados por Marcelão et al. (2024) e Altafini et al. (2021) ao avaliarem OTA em amostras de queijos artesanais brasileiros (LQ = 0,95 µg/kg) e diferentes tipos de queijos italianos (LQ = 1 µg/kg), respectivamente. A extração nesses dois estudos envolveu etapas de purificação com colunas de imunoafinidade, aumentando a complexidade e o custo do método. No presente estudo, ao contrário

dos citados, foi avaliada uma análise multianalito (ocratoxina A e aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1) no QMACFN. Ainda que o método proposto tenha apresentado valores de LQ superiores aos determinados pelos métodos previamente citados, o mesmo tem a vantagem de não empregar etapa de purificação, podendo ser considerado simples e economicamente viável para análises de micotoxinas em QMACFN.

Atualmente, não existem limites regulamentados para a presença de OTA em queijos, até o momento apenas a Eslováquia, país membro da União Européia, estabeleceu um nível máximo de OTA em leite de 5 μg/kg (Duarte et al. 2010). A Comissão Europeia solicitou à Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) que atualizasse seu parecer de 2006 sobre OTA em alimentos, visto a grande contribuição de queijos maturados por fungos para a exposição à esta toxina (EFSA 2020). Comparando com limites máximos de OTA estabelecidos pela EC (2006) para outras matrizes, como o café solúvel (5 μg/kg), o limite de quantificação detectado no presente estudo (1,9 μg/kg) apresenta-se significativamente inferior, o que reforça a sensibilidade do método empregado. Em relação às aflatoxinas, a legislação brasileira estabelece limite exclusivamente para AFM1 em queijos de forma geral (Brasil 2022). O LQ determinado neste estudo para AFM1 foi de 0,76 μg/kg, ou seja, pelo menos 3 vezes menor que o limite de 2,5 μg/kg estabelecido pela legislação brasileira. No regulamento da EU não há limites estabelecidos para AFM1 no queijo, apenas para leite (0,05 μg/kg) destinado a fabricação de derivados (EC 2006).

Análise de ocorrência em amostras reais de QMACFN

O método validado foi aplicado à análise de 30 amostras de QMACFN, coletadas em diferentes regiões produtoras do estado de Minas Gerais, Brasil, para avaliar a presença das micotoxinas. Contudo, nenhuma das micotoxinas investigadas neste estudo foi detectada nas amostras avaliadas, exceto a AFM1 em uma única amostra, onde foi registrado um sinal cromatográfico detectável, porém com concentração abaixo do limite de quantificação (Figura S1). Adicionalmente, amostras com maior tempo de maturação e presença visível de fungos na superfície foram analisadas por meio de uma maior amostragem da casca dos queijos, considerando-se a possibilidade de uma maior concentração de micotoxinas. Ainda assim, não foi possível detectar as micotoxinas alvo.

Níveis não detectáveis de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) também foram relatados por Cañás et al. (2023) ao avaliar amostras de queijos maturados com fungos produzidos na Espanha. Os autores observaram a presença de OTA em níveis variando de 4,88 μg/kg a 9,64 μg/kg em apenas 3 amostras das 38 avaliadas. Resultados semelhantes foram observados por Kokkonen et al. (2005) ao não detectarem a presença de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) e OTA em amostras de queijo de mofo branco e mofo azul obtidos do comercio local da Finlândia. Os autores justificam esses resultados em função das boas práticas de fabricação aplicadas na produção dos queijos, rigorosamente controlados para evitar contaminação por fungos e produção de micotoxinas. Em contrapartida, recentemente, um estudo reportou a presença de OTA em 22% das amostras de queijos artesanais brasileiros, sendo que das 130 amostras analisadas, 5 apresentaram valores acima de 1000 μg/kg. Estas amostras eram caracterizadas por sua maturação em ambientes com temperatura e umidade propícias ao desenvolvimento de espécies toxigênicas, denominados cavernas (Marcelão et al. 2024).

A ausência de micotoxinas nos queijos avaliados pelo presente estudo pode ser atribuída a diversos fatores, como a aplicação de boas práticas de fabricação pelos produtores, características do próprio substrato e manutenção das condições ambientais. Uma vez que os fungos são seres amplamente distribuídos e encontrados em diversos ambientes, inclusive na própria queijaria, a aplicação de boas práticas no processamento do queijo

pode minimizar o risco de proliferação de fungos com consequente produção de micotoxinas. Além disso, a aplicação de boas práticas agropecuárias, como o manejo nutricional adequado pela qualidade e condições de armazenagem da ração fornecida aos animais, pode evitar a contaminação indireta dos queijos pelo leite empregado na fabricação, no caso da AFM1.

Assim como o crescimento fúngico, a produção de micotoxinas também é modulada por diferentes fatores, como a composição do queijo e o estado fisiológico da cepa, além das condições ambientais. Pesquisadores afirmam que o desenvolvimento fúngico e a produção de toxinas por cepas toxigênicas está associado a temperatura entre 25 e 30 °C e alta umidade (Martin e Cotter 2023; Hymery et al. 2014). Papadimitriou, et al. (2015) afirmam que algumas espécies fúngicas presentes nos queijos artesanais desenvolveram uma estratégia de adaptação e uma capacidade de controlar o desenvolvimento de fungos toxigênicos como agentes de biocontrole. *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica*, espécies frequentemente encontradas em queijos artesanais (Souza et al. 2022; Aragão et al. 2023; Martin et al. 2023; Cardoso et al. 2015), têm sido destacadas por seu importante papel em mecanismos de biocontrole, inibindo fungos deteriorantes e toxigênicos (Yang et al. 2015; Sipiczki e Hrabovszki 2023; Decker e Nielsen 2005; Mitra et al. 2023).

Diante do exposto, a combinação dos fatores supramencionados pode ter contribuído para criar um ambiente desfavorável ao crescimento de fungos toxigênicos, inibindo sua proliferação e a produção de micotoxinas, e a detecção pelo método proposto.

Conclusão

O método validado neste estudo, baseado em "*dilute and shoot*" como técnica de extração e detecção por UPLC-MS/MS, demonstrou eficácia para identificar e quantificar as micotoxinas investigadas de forma precisa e consistente em queijos Minas artesanais de casca florida natural. A eficiência do método foi evidenciada pela alta sensibilidade, baixos limites de quantificação, com alta recuperação dos analitos, atendendo, dessa forma, aos critérios regulamentares, garantindo a precisão analítica mesmo em uma matriz complexa como o QMACFN.

A aplicação do método em amostras reais mostrou a ausência de micotoxinas detectáveis nas condições avaliadas. Esses resultados destacam a importância da atenção dos produtores às boas práticas agropecuárias e de fabricação, atendendo ao previsto em regulamentos específicos. O controle ambiental durante o processo de maturação também contribui na busca da minimização do risco de proliferação de fungos toxigênicos, com consequente contaminação por micotoxinas, garantindo a produção de queijos seguros e de alta qualidade.

Mesmo com a ausência das micotoxinas nas amostras avaliadas, o monitoramento contínuo destes contaminantes faz-se necessário, devido ao risco potencial de contaminação. Dessa forma, este estudo contribui significativamente para a segurança alimentar e para a preservação da qualidade do QMACFN, sendo potencialmente útil como base para a definição de regulamentações específicas sobre limites máximos toleráveis para esses contaminantes no produto.

Agradecimentos Os autores agradecem Laboratório de Micotoxinas da Fundação Ezequiel Dias pela parceria na realização deste trabalho. Os autores também agradecem aos produtores de queijo Minas artesanal do estado de Minas Gerais, Brasil, pelo fornecimento de amostras.

Contribuição do autor Fabiana Regina Lima: Conceitualização, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Recursos, Software, Escrita - rascunho original; Elisângela Jaqueline Magalhães: Conceitualização, Recursos, Curadoria de dados, Metodologia e Escrita - revisão e edição; Fabiana Reinis Franca Passamani: Recursos, Curadoria de dados, Software, Escrita - revisão e edição; Rafael von Sperling de Souza: Conceitualização, Investigação, Metodologia, Software, Escrita - revisão e edição; Fabiano Narciso Paschoal: Conceitualização , Investigação, Metodologia, Software, Escrita - revisão e edição; Raquel Eduardo Bickel: Análise formal, Metodologia, Escrita - revisão e edição; Mariana de Oliveira Almeida: Metodologia e Escrita - revisão e edição; Luís Roberto Batista: Conceitualização, Captação de recursos, Administração de projetos, Supervisão.

Financiamento Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Disponibilidade de Dados Os dados serão disponibilizados mediante solicitação.

Declarações

Aprovação de ética e **Consentimento de participação** Este artigo não contém nenhum estudo com participantes humanos ou animais realizados por nenhum dos autores.

Conflito de Interesses Fabiana R Lima declara que não tem conflito de interesses. Elisângela J Magalhães declara que não tem conflito de interesses. Fabiana F R Passamani declara que não tem conflito de interesses. Rafael v S Souza declara que não tem conflito de interesses. Fabiano N Paschoal declara que não tem conflito de interesses. Raquel E Bickel declara que não tem conflito de interesses. Mariana O Almeida declara que não tem conflito de interesses. Luis R Batista declara que não tem conflito de interesses.

Material suplementar Dados suplementares para este artigo podem ser encontrados online

Referências

Abreu DCP, da Silva Oliveira FA, Vargas EA, Madureira FD, Magalhães EJ, da Silva LP, Saczk AA (2020). Methodology development based on "dilute and shoot" and QuEChERS for determination of multiple mycotoxins in cocoa by LC-MS/MS. Anal Bioanal Chem. 412(8):1757-1767. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00216-020-02390-5.

Altafini A, Roncada P, Guerrini A, Minkoumba Sonfack G, Fedrizzi G, Caprai E (2021). Occurrence of Ochratoxin A in Different Types of Cheese Offered for Sale in Italy. Toxins. 13(8):540. Disponível em: https://doi.org/10.3390/toxins13080540.

Aragão MO, Costa FP, Ferreira MG, Silva EF, Souza RA, Pereira RA, Oliveira LP (2022). Fungal community and physicochemical profiles of ripened cheeses from the Canastra of Minas Gerais, Brazil. J Food Sci Technol. 59(12):4685-4694. https://doi.org/10.1007/s11483-022-01665-6.

Beltrán E, Ibáñez M, Sancho JV, Hernández F (2009). Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 23(12):1801-9. https://doi.org/10.1002/rcm.4077.

Benkerroum N (2016). Mycotoxins in dairy products: A review. Int Dairy J. 62:63-75. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.07.002.

Biancardi A, Piro R, Galaverna G, Dall'Asta C (2013). A simple and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ochratoxin A in hard cheese. Int J Food Sci Nutr. 64(5):632-40. https://doi.org/10.3109/09637486.2013.763911.

Braga DE, Souza RV, Paschoal FN, Bickel RE, Lima DP, Gonçalves JE, Gloria MBE (2023). Determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 and ochratoxin A in dry fermented sausages using a dilute and shoot method and LC–MS/MS. Food Anal Methods. 16:1437–1445.https://doi.org/10.1007/s12161-023-02511-7.

Brasil (2022) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Instrução Normativa - IN nº 160, de 1° de Julho de 2022. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Diário Oficial da União nº 126, de 6 de julho de 2022.

Cañas RI, Pérez S, Vázquez C, Velázquez R, Sánchez C, Suárez S, García S, Rodríguez A, Hernández M, Rodríguez J, García C, López M, González S, Díaz C (2023). Detection of mycotoxins in cheese using an optimized analytical method based on a QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS quantification. Food Chem. 408:135182.

Cardoso VM, Gomes TL, Souza RS, Silva IA, Cavalcanti FA, Oliveira MS, Santana MR, Leal AG, Ferreira RM (2015). The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. Food Res Int. 69:331-340.

Comissão Europeia (EC). Regulamento de Execução (EU) 2023/2782 da Comissão, de 14 de dezembro de 2023. Estabelece métodos de amostragem e análise para controle de teores de micotoxinas em gêneros alimentícios e revoga o Regulamento (CE) n.º 401/2006. Jornal Oficial da União Europeia, Série L, 15 dez. 2023.

Decker M, Nielsen PV (2005). The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated fungi of white mould cheese. Int J Food Microbiol. 104:51-60.

Duarte SC, Lino CM, Pena A (2010). Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: A review of the worldwide status. Food Addit Contam Part A. 27(10):1440-1450. https://doi.org/10.1080/19440049.2010.497166..

EFSA. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. The EFSA Journal, 18(5), 6113. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113

González-Jartín JM, Alfonso A, Rodríguez I, Sainz MJ, Vieytes MR, Botana LM (2019). A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer. Food Chem. 275:703-710. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.162.

González-Jartín JM, Alfonso A, Sainz MJ, Vieytes MR, Botana LM (2021). Multi-detection method for mycotoxins with a modified QuEChERS extraction in feed and development of a simple detoxification procedure. Anim Feed Sci Technol. 272:114745. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114745.

Hajrulai-Musliu Z, Uzunov R, Jovanov S, Kerluku M, Jankuloski D, Stojkovski V, Pendovski L, Sasanya JJ (2022). Determination of Veterinary Drug Residues, Mycotoxins, and Pesticide Residues in Bovine Milk by Liquid Chromatography Electrospray Ionisation-tandem Mass Spectrometry. J Vet Res. 66(2):215-224. https://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0027.

Hamed AM, Moreno-González D, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM (2017). Evaluation of a new modified QuEChERS method for the monitoring of carbamate residues in high-fat cheeses by using UHPLC-MS/MS. J Sep Sci. 40(2):488-496. https://doi.org/10.1002/jssc.201600845.

Huang LC, Zheng N, Zheng BQ, Wen F, Cheng JB, Han RW, Xu XM, Li SL, Wang JQ (2014). Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α-zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. Food Chem. 146:242-249. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.047.

Hymery N, Lévêque J, Canet A, et al. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. Compreh Rev Food Sci Food Safety. 13(4):437-456.

Kokkonen M, Jestoi M, Rizzo A (2005). Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled tandem with mass spectrometry. Food Addit Contam. 22:449-456. https://doi.org/10.1080/02652030500089861.

Malachova A, et al. Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. Anal Bioanal Chem. (2018) 410:801-825.

Marcelão CVP, Souza CL, Costa FM, et al. (2024). Unveiling ochratoxin A and ochratoxigenic fungi in Brazilian artisanal Cheeses: Insights from production to consumption. Food Res Int. 183:114214.

Martin JGP, Cotter PD (2023). Filamentous fungi in artisanal cheeses: A problem to be avoided or a market opportunity? Heliyon. 9(4):e15110. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15110.

Martin JGP, Ferreira C, Silva E, et al. (2023). Seasonal variation in the Canastra cheese mycobiota. Front Microbiol. 13:5437.

Mateus ARS, Barros S, Pena A, Silva AS (2021). Development and Validation of QuEChERS Followed by UHPLC-ToF-MS Method for Determination of Multi-Mycotoxins in Pistachio Nuts. Molecules. 26(19):5754. https://doi.org/10.3390/molecules26195754.

Medina BG, Sartori AV, Moraes MHP, Cardoso MHW, Jacob SC (2019). Validação e aplicação de um método analítico para a determinação de micotoxinas em biscoitos por UPLC-MS/MS. Food Sci Technol. 39(3):583-591. https://doi.org/10.1590/fst.33717.

Mitra M, Korkmaz Z, Ferreira JP, et al. (2023). Fruity-scented antifungal volatiles from endophytic *Geotrichum candidum* PF005: broad-spectrum bioactivity against stored grain pathogens, mode of action and suitable formulation for mycofumigation. Biol Control. 177:105129.

Mudannayake A, Karunarathne S, Jayasooriya PW, Nanayakkara D, Abesooriya A, Silva S, Fernando R (2024). Occurrence of aflatoxin M1 in cheese products commonly available in Sri Lankan market. Heliyon. 10(15):e35155. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35155.

Nakhjavan B, Ahmed NS, Khosravifard M (2020). Development of an Improved Method of Sample Extraction and Quantitation of Multi-Mycotoxin in Feed by LC-MS/MS. Toxins (Basel). 12(7):462. https://doi.org/10.3390/toxins12070462.

Panara A, Katsa ME, Kostakis M, Bizani E, Thomaidis NS (2022). Monitoring of Aflatoxin M1 in Various Origins Greek Milk Samples Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Separations. https://doi.org/10.3390/separations9030058.

Papadimitriou K, Pot B, Tsakalidou E. How microbes adapt to a diversity of food niches. Curr Opin Food Sci. (2015) 2:29-35.

Paschoal FN, Silva DA, Souza RvS, Oliveira MS, Pereira DAA, Souza SVC (2017). A Rapid single-extraction method for the simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, fumonisin B1, and zearalenone in corn meal by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Anal Methods. 10(6):1631–1644. https://doi.org/10.1007/S12161-016-0712-2.

Sartori AV, Mattos JS, Moraes MHP, Nóbrega AW (2015). Determination of aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in UHT and powdered milk by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Anal Methods. 8:2321–2330.

Scheilla VC de Souza, Carlos T Pinto, Roberto G Junqueira (2007). In-house method validation: Application in arsenic analysis. J Food Compos Anal. 20(3-4):241-247. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.09.002.

Silva IMdM, da Cruz AG, Ali S, Freire LGD, Fonseca LM, Rosim RE, Corassin CH, Oliveira RBA d, Oliveira CAF d (2023). Incidence and Levels of Aflatoxin M1 in Artisanal and Manufactured Cheese in Pernambuco State, Brazil. Toxins. 15(3):182. https://doi.org/10.3390/toxins15030182.

Sipiczki M, Hrabovszki V (2023). Diversity of Galactomyces candidus in the complex mycobiota of cow's milk bryndza cheese comprising antagonistic and sensitive strains. Int J Food Microbiol. 110088.

Skrbic B, Antić I, Živančev J (2015). Presence of aflatoxin M1 in white and hard cheese samples from Serbia. Food Control. 50:111–117. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.031.

Socas-Rodríguez B, Herrera-Herrera AV, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MA (2017). Multiresidue determination of estrogens in different dairy products by ultra-high-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. J Chromatogr A. 1496:58-67. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.034.

Son HH, Yun WS, Cho SH (2020). Development and validation of an LC-MS/MS method for profiling 39 urinary steroids (estrogens, androgens, corticoids, and progestins). Biomed Chromatogr. 34(2):e4723. https://doi.org/10.1002/bmc.4723.

Souza SVC, Junqueira RG (2005). A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. Anal Chim Acta. 552(1–2):25–35. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.043.

Souza TP, Evangelista SR, Passamani FRF, Bertechini R, Abreu LR de, Batista LR (2021) Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. Int Dairy J. 120:105085. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105085.

Su B-D, Li X-M, Huang Z-W, Wang Y, Shao J, Xu Y-Y, Shu L-X, Li Y-B (2024). Development and application of the physiologically-based toxicokinetic (PBTK) model for ochratoxin A (OTA) in rats and humans. Ecotoxicol Environ Saf. 276:116277. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116277.

Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. Rapid Commun Mass Spectrom. 20(18):2649–59. https://doi.org/10.1002/rcm.2640.

Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure Appl Chem. (2002) 74(5):835–855.

UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura) Traditional ways of making Artisan Minas Cheese in Minas Gerais. Disponível em: https://ich.unesco.org/en/RL/traditional-ways-of-making-artisan-minas-cheese-in-minas-gerais-02102. Acessado em Dec 14, 2024.

Wang H, Zhou XJ, Liu YQ, Yang HM, Guo QL. Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M1 residues in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Agric Food Chem. (2011) 59(8):3532-8. https://doi.org/10.1021/jf2006062.

Yang Q, Wang J, Zhang H, Li C, Zhang X. Ochratoxin A is degraded by *Yarrowia lipolytica* and generates non-toxic degradation products. World Mycotoxin J. (2016) 9(2):269–278.

Zöllner P, Mayer-Helm B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. J Chromatogr A. (2006) 1136(2):123-69. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.055.

Material Suplementar

Tabela S1 Condições de espectrometria de massa para análise de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1 e ocratoxina A por UPLC-MS/MS.

Micotoxinas	Íon Precursor (m/z)	Tempo de retenção (min)	Voltagem do Cone (V)	Quantificação		Confirmação	
				Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
Aflatoxina B1	313.3	4.10	50	285.1	22	241.1	36
Aflatoxina B2	315.3	3.85	40	287.1	25	259.1	30
Aflatoxina G1	329.1	3.62	30	243.1	27	283.1	25
Aflatoxina G2	331.1	3.36	30	245.1	30	257.1	30
Ocratoxina A	404.1	5.56	30	329.0	23	221.0	35
Aflatoxina M1	329.1	3.40	59	273.1	23	301.1	17

Tabela S2 Parâmetros obtidos do teste de linearidade para as curvas produzidas em solvente e em matriz.

Micotoxina	Solvente				Matrizada		
	Faixa linear (ng/mL)	Equação linear	R^2	N	Equação linear	R^2	N
Aflatoxina B1	0,121-0,727	y = 281547x + 1690.7	0,999	18	y = 148218x + 2091	0,999	18
Aflatoxina B2	0,120-0,719	y = 185609x + 2587.8	0,999	16	y = 96389x + 902.14	0,999	15
Aflatoxina G1	0,120-0,718	y = 254652x + 2015.3	0,999	16	y = 43076x + 84.44	0,995	18
Aflatoxina G2	0,121-0,723	y = 90651x + 2857.6	0,998	16	y = 26302x + 8.0387	0,995	16
Ocratoxina A	0,048-0,298	y = 31683x + 526.6	0,999	18	y = 17973x + 304.23	0,999	15
Aflatoxina M1	0,120-0,723	y = 95283x + 763.54	0,998	15	y = 67569x + 461.06	0,991	17

R^2 = coeficiente de determinação; N = número de observações após tratamento de *outlier.*

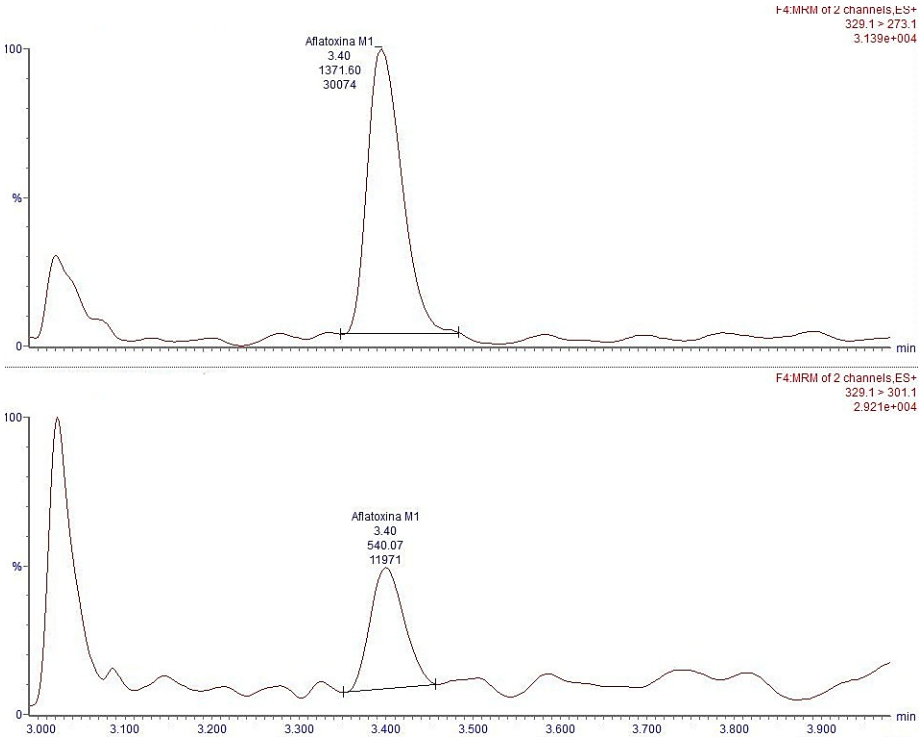


Figura S1 Cromatograma obtido para análise de AFM1 em uma das amostras de QMACFN coletadas.

ARTIGO 3 – Validação de método de extração unificado para determinação de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) e ocratoxina A em Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural por ELISA e HPLC-FLD

Formatado de acordo com as diretrizes do Food Control
ISSN: 1936-976X
(versão preliminar)

Fabiana Regina Lima[a*], Fabiana Franca Reinis Passamani[a], Rafael von Sperling de Souza[b], Fabiano Narciso Paschoal[b], Raquel Eduardo Bickel[b], Mariana de Oliveira Almeida[b], Elisângela Jaqueline Magalhães[c], Luís Roberto Batista[a**]

[a]Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos. Caixa Postal 3037 - CEP: 37203-202, Lavras, MG - Brasil.
[b]Laboratório de Micotoxinas, Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira - CEP: 30510-010, Belo Horizonte, MG - Brasil
[c]Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos. Caixa Postal 3037 - CEP: 37203-202, Lavras, MG - Brasil.

*Autor correspondente

**Autor correspondente

Endereços de e-mail: fabianalima1818@hotmail.com (Fabiana Regina Lima), luisrb@ufla.br (Luís Roberto Batista)

RESUMO

Os queijos artesanais são amplamente valorizados no Brasil, sendo o estado de Minas Gerais destaque na produção dos renomados Queijos Minas Artesanais (QMA), cujo modo de produção é reconhecido como Patrimônio Imaterial da Humanidade. Como resultado do método artesanal de produção e maturação, este produto pode apresentar condições favoráveis para a colonização de fungos toxigênicos. A ocorrência de micotoxinas em queijos artesanais é bem documentada mundialmente, mas a escassez de informações sobre os produtos nacionais e a ausência de limites regulatórios ainda é significativa. Este estudo teve como objetivo a validação e a comparação do desempenho entre um método ELISA e um método HPLC-FLD, adotando um protocolo de extração unificado, para o monitoramento de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e ocratoxina A em QMA de casca florida natural (QMACFN). O método HPLC-FLD apresentou valores de recuperação que variaram de 84,60% a 108,77%. Pelo método ELISA, os valores de recuperação variaram entre 87,30% e 109,79%, indicando equivalência entre os métodos. O método cromatográfico apresentou limites de detecção variando de 0,11 a 0,43 µg/kg µg/kg e de quantificação de 2 µg/kg. O ELISA mostrou limites de detecção e quantificação, respectivamente, de 5,26 e 7,95 µg/kg para aflatoxina total e 3,21 e 4,86 µg/kg para ocratoxina A. Vinte e seis amostras de QMACFN de diferentes regiões foram analisadas por ambos os métodos desenvolvidos e nenhuma das micotoxinas investigadas foi detectada. Estudos como esse ajudam a desenvolver ferramentas confiáveis para detectar micotoxinas, garantindo a segurança alimentar e apoiando a criação de limites regulatórios para estes contaminantes em queijos.

Palavras-chaves: Queijos artesanais; Fungos; Micotoxinas; Validação de métodos; ELISA; HPLC-FLD.

1. Introdução

Os queijos artesanais produzidos com leite cru são amplamente valorizados no Brasil. A maior parte desses produtos é elaborada em pequenas propriedades espalhadas por diversas regiões do país, algumas das quais possuem denominação de origem protegida e reconhecidas por premiações dentro e fora do país (Pineda et al., 2021). Minas Gerais se destaca como o principal estado produtor desses queijos no país, abrangendo regiões certificadas como produtoras dos renomados Queijos Minas Artesanais (QMA), que possuem grande relevância econômica, social e cultural, sendo seu modo de produção tradicional, passado entre gerações, e atualmente reconhecido como Patrimônio Imaterial da Humanidade (UNESCO, 2024).

O Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural (QMACFN) é caracterizado pela presença predominante de fungos brancos que se desenvolvem em sua superfície durante o processo de maturação. Sua fabricação segue técnicas tradicionais, que são passadas por gerações, com produção em baixa escala a partir da mão de obra familiar, em queijarias edificadas nas próprias propriedades rurais (Minas Gerais, 2024; Eça et al., 2022). Como resultado do método artesanal empregado na produção e maturação, o queijo pode ser colonizado por uma ampla variedade de microrganismos, provenientes não apenas dos ingredientes utilizados, mas também do setor de produção, superfícies de contato, utensílios e do próprio ar ambiente. Dentro desse contexto, Martin e Cotter (2023) afirmam que o crescimento de fungos em queijos artesanais pode ser considerado sob duas perspectivas, ou seja, a composição e a abundância de fungos na superfície do queijo podem contribuir significativamente na geração de atributos sensoriais desejáveis durante a maturação, ao mesmo tempo em que podem estar relacionadas a riscos associados à produção de micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos, associadas a sérios problemas de saúde (Kumar et al., 2017).

Alguns estudos têm identificado a presença de fungos toxigênicos e micotoxinas em queijos artesanais maturados. Espécies produtoras de aflatoxina B1 (AFB1) e B2 (AFB2) foram reladas em pesquisa realizada por Souza et al. (2020) na avaliação de queijo Minas artesanal do Serro. Marcelão et al. (2024), ao avaliarem queijos artesanais produzidos no estado de Minas Gerais e São Paulo, relataram a presença de espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* e detecção de ocratoxina A (OTA) em 22% das amostras. A ocorrência de aflatoxina G1 (AFG1) e G2 (AFG2) foi reportada por Kilicel et al. (2017) em queijos maturados produzidos na Turquia.

Diferentes metodologias têm sido propostas para a análise de micotoxinas em matrizes diversas, incluindo técnicas de triagem como ensaio imunoenzimáticos (ELISA) e técnicas de confirmação como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada à detecção por espectrometria de massa (MS), fluorescência (FLC) ou ultravioleta (UV). Zheng et al. (2005) cita que os kits de teste ELISA são métodos rápidos, simples, específicos, sensíveis e portáteis, o que os tornaram métodos mais comuns para a detecção de micotoxinas em alimentos e rações.

Os kits de teste ELISA devem ser utilizados apenas em alimentos para os quais tenham sido previamente validados, considerando que os anticorpos empregados frequentemente apresentam reatividade cruzada com compostos estruturalmente semelhantes às micotoxinas. Por isso, é essencial conduzir estudos extensivos sobre a exatidão e a precisão do método nas matrizes alimentares, garantindo sua confiabilidade antes da aplicação prática (Zheng et al., 2005). A disponibilidade de kits comerciais para a avaliação de diferentes micotoxinas em queijos é limitada, estando disponíveis alguns kits para micotoxinas específicas, como aflatoxina M1 ou, em outros casos, kits que requerem adaptação para serem aplicados em produtos lácteos, como queijos.

Em relação aos métodos confirmatórios, embora os atuais, como HPLC-MS/MS tenham sido reportados em vastas aplicações nas análises de múltiplas micotoxinas em alimentos, a HPLC-FLD ainda é amplamente usado para quantificar diferentes micotoxinas, como as aflatoxinas, sendo considerado um método oficial de análise destes compostos em alimentos (AOAC, 2012).

As características intrínsecas dos queijos, como o alto teor de gordura e proteínas, juntamente com a complexidade química das micotoxinas que podem ser encontradas nesses produtos, representam um desafio significativo para o desenvolvimento de métodos analíticos. Consequentemente, há disponibilidade limitada de técnicas específicas para a extração e quantificação de micotoxinas em queijos (Canas et al., 2023), justificando o desenvolvimento do presente trabalho. Vale ressaltar que um adequado e confiável método para análise de micotoxinas deve ser sensível, seletivo, preciso e de baixo custo. Porém, praticamente, ainda não existe um método tão perfeito, especialmente porque diferentes micotoxinas podem estar presentes em matrizes alimentícias em baixas concentrações. Assim, a separação e discriminação de analitos alvo e a redução ou eliminação de interferentes tornaram-se uma das etapas mais críticas em todo o processo analítico.

Considerando a ocorrência de micotoxinas pela presença de espécies fúngicas toxigênicas em queijos artesanais maturados, além de ser fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes para a detecção e quantificação de micotoxinas nesses produtos, destaca-se a importância de um monitoramento constante, visando a definição de parâmetros que assegurem a proteção da saúde do consumidor. O monitoramento da presença de micotoxinas é especialmente útil, visto a falta de limites regulatórios para as aflatoxinas e a OTA em queijos. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo a validação e a comparação do desempenho entre um método ELISA e um método por HPLC-FLD, adotando um protocolo de extração unificado, para o monitoramento de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) e ocratoxina A em QMACFN.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes e soluções

Os padrões de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA e a solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrila e metanol (grau HPLC) foram adquiridos da J. T. Baker (Center Valley, PA, EUA). Diclorometano (99,5%) e acetato de etila (>99,8%) foram fornecidos pela Biograde (Durham, EUA). Ácido fosfórico (pureza >96%), n-hexano (>96%), ácido acético (pureza >99%) Tolueno (>99,8%), brometo de potássio (>99%) e hidróxido de sódio (>99%) (NaOH) foram obtidos da Merck (Kenilworth, NJ, EUA). Água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha). A determinação de aflatoxina total e ocratoxina A por ELISA foi realizada usando os kits de Teste ELISA AgraQuant ® (Romer Labs, Getzersdorf, Áustria).

Soluções estoque padrão de aproximadamente 10 µg/mL foram preparadas para AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 e de aproximadamente 40 µg/mL para OTA. Alíquotas de soluções padrão individuais de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 foram diluídas com metanol, resultando em uma solução intermediária combinada com concentração de 1,01 µg/mL para AFB1, 0,998 µg/mL para AFB2 e AFG1, e 1,005 µg/mL para AFG2. A solução estoque de OTA foi diluída em tolueno:ácido acético (99:1 v/v), para obter solução com concentração de 1,004 µg/mL. Todas as soluções foram armazenadas em freezer a -20 ºC.

2.2. Amostragem

Um total de 26 amostras de QMACFN, com, em média, 22 dias de maturação, foram coletadas em quatro regiões produtoras certificadas no estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2020 e 2024. As amostras foram provenientes de 12 queijarias distribuídas nas microrregiões de Diamantina (n=12), Campo das Vertentes (n=8), Canastra (n=4) e Cerrado (n=2). As amostras foram transferidas para sacos plásticos estéreis, transportadas sob refrigeração em caixas térmicas com gelo reutilizável e armazenadas à -20 ºC até realização das análises.

Amostras constituídas de pontos equidistantes de um queijo inteiro foram finamente raladas e, subsequentemente, aplicadas ao procedimento de extração. Para a otimização e ensaios de validação dos métodos, amostras brancas de QMA, obtidas no comércio local, foram empregadas, tendo sido previamente avaliadas sobre a presença de micotoxinas investigadas neste estudo.

2.3. Otimização das condições de extração

A otimização foi conduzida para a obtenção de condições ótimas de extração, assegurando a determinação eficaz dos analitos de interesse, ocratoxina A e aflatoxinas, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, tanto por ELISA quanto por HPLC-FLD, a partir de um único procedimento experimental para o preparo da amostra. A eficiência do processo de extração foi avaliada por meio de ensaios de fortificação e recuperação, desenvolvidos com base em protocolos padronizados para a quantificação de micotoxinas em diferentes matrizes alimentares, como grãos e produtos cárneos, e de AFM1 em queijos (Romer Labs, 2024; R-Biopharm, 2024; Abraxis, 2024; Gompa, 2013) com modificações para o QMACFN.

A fim de se estimar o método mais promissor, as amostras brancas de QMA, foram contaminadas artificialmente, em triplicata, com 15 µg/kg de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA, mantidas *overnight*, e submetidas ao procedimento de extração conforme metodologias descritas na Tabela 1.

A eficiência da extração foi avaliada inserindo uma determinada massa de QMACFN, em tubos Falcon de 50 mL de capacidade, junto com um determinado volume de solvente extrator. A mistura foi agitada em agitador tipo *multi-wrist* (Lab-line™, Cairo, Egito) ou em vórtex, podendo ser seguida de etapas de concentração com evaporação sob fluxo de nitrogênio e/ou centrifugação (Jouan BR4i, Saint-Herblain, França). A eficiência do hexano no desengorduramento do extrato com hexano também foi avaliada (Tabela 1).

Tabela 1 - Ensaios para determinar a eficiência da extração de micotoxinas em amostras do QMACFN.

Método	Massa*	Solvente extrator	Agitação	Características/modificações	Adaptado de
A	4 g	20 mL de metanol:água (70:30, v/v)	3 min. em agitador de pulso múltiplo	Filtração em papel de filtro Whatman nº1. Ajuste do pH do filtrado para 6-8 com solução de NaOH à 5% com posterior análise.	Romer Labs, 2024
B	2 g	40 mL de diclorometano	30 min em agitador de pulso múltiplo	Centrifugação (2.500g, 10 minutos). Alíquota de 5 mL evaporada à 50 ºC. O extrato seco foi reconstituído com 500 µL de metanol, 500 µL de solução tampão PBS e 1 mL de hexano. Após 1 minuto de agitação em vórtex, 400 µL da fase inferior foi acrescida de 600 µL de solução tampão PBS, agitada e analisada.	Romer Labs, 2024
C	5 g	20 mL de metanol:água (70:30, v/v)	1 min em vórtex	Aquecimento da mistura à 50 ºC, por 30 minutos, com agitação em vórtex (1 min) a cada 6 minutos. Centrifugação (2.500g, 10 minutos). Alíquota de 1 mL do extrato adicionada de 1 mL de hexano. Agitação em vórtex (1 min) e centrifugação (19.700g, 10 minutos, à 4 ºC). Uma alíquota (100 µL) da fase inferior foi diluída com 400 µL de solução tampão PBS, agitada e analisada.	R-Biopharm, 2024
D	4 g	20 mL de metanol:bicarbonato de sódio 0,1% (50:50, v/v)	30 min em agitador de pulso múltiplo	Centrifugação (2.500g, 10 minutos). Alíquota de 1 mL adicionada de 1 mL de hexano e agitada em vórtex (1min). Posteriormente o extrato (200 µL) foi centrifugado (19.700g, 10 minutos, à 4 ºC) e então analisado.	Abraxis, 2024
E	4 g	20 mL diclorometano:acetato de etila (50:50, v/v)	15 min em agitador de pulso múltiplo	Centrifugação (2.500g, 10 minutos). Alíquota de 5 mL evaporada à 50 ºC sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi ressuspenso em 250 µL de metanol, 750 µL de solução tampão PBS e 1mL de hexano e agitado em vórtex (2min). A fase inferior do extrato (200 µL) foi, então, acrescida de 800 µL de solução tampão PBS, centrifugada (19.700g, 10 minutos, a 4 ºC) e analisada.	Gompa, 2013
E*	4 g	20 mL diclorometano:acetato de etila (50:50, v/v)	15 min em agitador de pulso múltiplo	Conforme descrito no método E, sendo que após etapa de evaporação o resíduo foi reconstituído com 250 µL de metanol, 750 µL de solução tampão PBS e 1 mL de hexano com posterior agitação em vórtex (2 min.). Fase inferior do extrato (200 µL) foi, então, acrescida de 800 µL de solução tampão PBS, centrifugada (19.700g, 10 minutos, a 4 ºC) e analisada.	Gompa, 2013

*Massa da amostra.

2.3.1. Condições ótimas do método de extração

Quatro gramas da amostra foram misturados à 20 mL de diclorometano:acetato de etila (50:50, v/v). A mistura foi agitada por 15 minutos em um agitador *multi-wrist* e, em seguida, centrifugada a 2.500g, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, 5 mL do sobrenadante foram transferidos para um frasco

âmbar e evaporados, à 50 ºC, sob fluxo de nitrogênio. O resíduo obtido foi ressuspenso em 250 µL de metanol e 750 µL de solução tampão PBS, com posterior adição de 1 mL de hexano e agitação em vórtex, por 1 minuto. Em seguida, 200 µL do extrato (fase inferior) foram coletados e misturados com 800 µL de solução tampão PBS. Finalmente, a amostra foi centrifugada a 19.700g por 10 minutos a 4 ºC, filtrada em filtro de seringa de 0,22 µm (GE UnifloTM – Whatman, Amersham, Reino Unido) imediatamente antes da análise.

2.3.2. Método ELISA para determinação de aflatoxina total e de ocratoxina em QMACFN

As análises consistiram em extrair os analitos da amostra, pelo procedimento de extração previamente otimizado e submetê-lo à reação inumoenzimática pelo kit de teste AgraQuant (Romer Labs, Getzersdorf, Áustria). Para isso, o extrato entra em contato com o conjugado contendo toxina e enzima. A toxina conjugada compete com o analito pelos sítios de ligação dos anticorpos presentes nos poços do kit de teste ELISA. Após uma etapa de lavagem, a atividade da enzima ligada é determinada adicionando uma quantidade fixa de um substrato cromogênico que é convertido de incolor em azul durante a incubação. A adição de um reagente de parada leva a uma mudança de cor de azul para amarelo. A absorbância é medida por um leitor de microplacas (Biotek EL808) a 450 nm. O desenvolvimento da cor é inversamente proporcional à concentração da micotoxinas presente na amostra de queijo ou nas soluções padrão de calibração.

A determinação da concentração de micotoxinas nos QMACFN, a partir de curvas analíticas obtidas em 5 níveis de concentração, sendo 0, 4, 10, 20, 40 µg/kg para aflatoxina total e 0, 2, 5, 20, 40 µg/kg para a ocratoxina A, foi feita utilizando o software GEN5^{TM} (Biotek).

2.3.3. Método HPLC-FLD para determinação de Aflatoxina B1, B2, G1 e G2 e ocratoxina A em QMACFN

Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu (Prominence), acoplado a um detector de fluorescência, RF-10AXL (HPLC-FLD) foi empregado para determinar a presença de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA em QMACFN. O sistema é equipado com uma bomba LC-20AT, um desgaseificador on-line DGU-20A5, e um controlador de sistema CBM-20A. O volume de 50 µL foi injetado por um amostrador automático SIL-20AHT equipado com uma seringa Hamilton de 500µL de capacidade. A separação cromatográfica ocorreu em modo de eluição isocrático, por 10 minutos, em uma coluna Shim-pack CLC-ODS(M) C18 (4,6 × 250 mm, 5,0 µm, Shimadzu Kyoto, Japão) de fase reversa com temperatura ajustada em 30°C em um forno de colunas CTO-20AC.

Para detecção e quantificação das aflatoxinas, a fase móvel foi composta por metanol, acetonitrila e solução aquosa de ácido fosfórico 0,1% (24:24:52, v/v/v) contendo brometo de potássio (0,12 g/L) com vazão de 1 mL/min. A derivatização pós-coluna foi realizada com bromo gerado eletroquimicamente em Kobra Cell® (R-Biopharm, Alemanha). Os comprimentos de onda para detecção das aflatoxinas foram 364 e 440 nm como para excitação e emissão, respectivamente. Para análise de OTA, utilizou-se fase móvel composta por acetonitrila, metanol e solução aquosa de ácido acético glacial (35:35:30, v/v/v) a uma vazão de 1 mL/min e volume de injeção de 50 µL. O detector de fluorescência foi ajustado em 333 nm para excitação e 476 nm para emissão e o tempo de execução da análise foi de 13 min. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. O procedimento operacional do instrumento foi controlado por meio do software LC Solution (Shimadzu Kyoto, Japão).

2.4. Validação dos métodos

2.4.1. Método HPLC-FLD

Seletividade, linearidade, efeitos de matriz, exatidão, precisão sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, e limites de detecção e quantificação foram as figuras de mérito aplicadas no processo de validação do método por HPLC-FLD. O desempenho do método foi avaliado segundo os critérios estabelecidos pelo Regulamento de Execução (EU) 2023/2782 da Comissão (EC, 2023) e pelo Manual da Garantia da Qualidade Analítica (Brasil, 2015).

A seletividade foi avaliada pelos perfis dos cromatogramas obtidos das análises de amostra branca de queijo Minas artesanal e de amostra branca fortificada com aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e com ocratoxina A, verificando a presença de possíveis interferências que eluíssem no mesmo tempo de retenção das micotoxinas pesquisas neste estudo.

A linearidade do método foi avaliada na faixa de 0,400 a 2,500 ng/mL, com seis níveis de concentração (Tabela 2) e três replicatas por nível. Todas as soluções foram separadamente preparadas e a sequência foi aleatoriamente analisada. Para a construção das curvas analíticas, produzidas em solvente e em extrato da matriz, soluções intermediárias foram obtidas com *pool* de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. A partir da referida solução foram obtidas soluções de trabalho, inclusive para a OTA. Alíquotas das soluções de trabalho, com volumes adequados para corresponder aos níveis de concentração da faixa linear da curva analítica, foram colocadas em frascos protegidos da luz, sendo o solvente evaporado até a secura sob leve corrente de nitrogênio, à temperatura ambiente. O resíduo foi ressuspenso em 5 mL do extrato da matriz, no caso de curva matrizada, ou em metanol:água (1:1, v/v), para a curva construída em solvente.

Cabe enfatizar que os níveis de concentração empregados na avaliação da linearidade foram estabelecidos com base na legislação para a determinação de AFM1 em queijos (Brasil, 2022). Também foram considerados limites estabelecidos para as demais micotoxinas estudadas em outras matrizes, visto a falta de regulamentos nacionais e internacionais que definam tais limites para essas substâncias em queijos.

Tabela 2 - Concentrações de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e ocratoxina A utilizadas na construção das curvas analíticas.

Micotoxinas	Concentração (ng/mL)					
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6
Aflatoxina B1	0,425	0,850	1,275	1,700	2,125	2,550
Aflatoxina B2	0,419	0,838	1,257	1,677	2,096	2,515
Aflatoxina G1	0,419	0,838	1,257	1,676	2,095	2,514
Aflatoxina G2	0,421	0,843	1,265	1,687	2,109	2,531
Ocratoxina A	0,421	0,843	1,265	1,686	2,108	2,530

Para a quantificação e avaliação da linearidade, a concentração de cada analito foi plotada em relação às áreas das micotoxinas para determinar os coeficientes de determinação (R^2). Os parâmetros das curvas analíticas foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, sendo verificadas as premissas de normalidade (teste de Ryane Joiner), homoscedasticidade (teste de Brown e Forsythe), independência dos resíduos da regressão

(teste de Durbin e Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (ANOVA). *Outliers* foram investigados pelo teste de Jacknife.

Para avaliação do efeito de matriz, duas curvas analíticas foram preparadas segundo os procedimentos anteriormente descritos, sendo uma em solvente e outra em extrato da matriz. A interferência da matriz foi avaliada comparando as inclinações e os interceptos das curvas analíticas preparadas em solvente com aquelas preparadas em extrato da matriz, utilizando o Teste T de *Student* para a análise estatística (Souza et al. 2007).

A exatidão e a precisão foram avaliadas por ensaios de fortificação em amostra branca. A exatidão e a precisão foram avaliadas em dois níveis de concentração (Tabela 4), com 5 replicatas independentes para cada nível. A repetibilidade foi executada no mesmo dia pelo mesmo analista. Para simular condições de precisão intermediária, dois lotes analíticos foram obtidos, sendo o ensaio de repetibilidade reproduzido em diferentes dias e por diferentes analistas, totalizando 10 replicatas para cada nível de concentração estudado (Brasil, 2015). As porcentagens médias de recuperação foram obtidas para cada nível de concentração, após interpolação de cada resposta do analito na correspondente curva de calibração, comparando a concentração das micotoxinas obtidas pelo método previamente otimizado com a concentração na matriz fortificada. As porcentagens médias de recuperação obtidas para cada nível de concentração foram comparadas com os critérios de aceitação estabelecidos, sendo considerados satisfatórios quando situados no intervalo de 70% a 120% (EC, 2023). Os resultados foram submetidos à análise de variância para estimar os desvios-padrão relativos (RSD) sob condições de repetibilidade e precisão intermediária. O método foi considerado preciso quando tais valores mostraram-se inferiores a 20% para todos os analitos investigados (EC, 2023).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) teóricos foram calculados pelos resultados obtidos das curvas analíticas matrizadas, sendo definidos como, respectivamente, três e dez vezes o desvio padrão do intercepto dividido pela inclinação das curvas.

2.4.2. Método ELISA

A validação do método otimizado para determinação de aflatoxina total e de ocratoxina A em amostras de QMACFN por ELISA foi conduzida a partir de ensaios de exatidão e precisão, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, e determinação dos limites de detecção e quantificação.

A exatidão e a precisão foram avaliadas por ensaios de fortificação em amostra branca, em dois níveis de concentração (Tabela 4), com 5 replicatas independentes. A repetibilidade foi executada no mesmo dia, pelo mesmo analista. Para estimar a precisão intermediária, as análises foram realizadas em outro dia, por mais um analista, totalizando 10 replicatas para cada nível de concentração (Brasil, 2015). As porcentagens médias de recuperação foram obtidas para cada nível de concentração, após interpolação de cada resposta do analito na correspondente curva de calibração, comparando a concentração das micotoxinas obtidas pelo método previamente otimizado com a concentração na matriz fortificada. As porcentagens médias de recuperação obtidas para cada nível de concentração foram comparadas com os critérios de aceitação estabelecidos, sendo considerados satisfatórios quando situados no intervalo de 70% a 120% (EC 2023). Os resultados foram submetidos à análise de variância para estimar os desvios-padrão relativos (RSD) sob condições de repetibilidade e precisão intermediária. O método foi considerado preciso quando tais valores mostraram-se inferiores a 20% para todos os analitos investigados (EC, 2023).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram determinados pela análise em replicada (n = 10) de uma amostra branca, sendo definidos, respectivamente, como três e dez vezes o desvio padrão somado ao valor médio da concentração obtida pelo método (Lin et al., 2024; Zheng et al., 2005).

3. Resultados e Discussão

3.1. Otimização das condições de extração

Buscando combinar altas porcentagens de recuperações dos diferentes analitos investigados (ocratoxina A e aflatoxina total) utilizando um único procedimento de extração para ambos os métodos analíticos, diferentes ensaios foram realizados como estratégias para obtenção de condições ideais para o preparo da amostra. Frente à ausência de kits de teste ELISA comercialmente disponíveis para a detecção específica de aflatoxinas totais e ocratoxina A em queijos, optou-se por investigar a aplicabilidade de kits validados para uso em grãos, cereais e castanhas.

Ao avaliar o desempenho do procedimento recomendado pelo fabricante dos kits de teste ELISA (Método A), baixas taxas de recuperação (11,78% a 32,61%) foram obtidas para todos os analitos, não atendendo as diretrizes de validação para as aflatoxinas e para ocratoxina A (70-120%) (EC, 2023; Brasil, 2015). A aplicação de protocolos de extração sugeridos por diferentes fabricantes de kits de teste ELISA (Métodos B, C e D) para matrizes diversas também não mostraram recuperações eficientes para os analitos investigados nas amostras de queijo, com recuperações que variaram de 28,73% à 157,21% para OTA e de 50,38% à 120,43% para aflatoxina total. Resultados semelhantes foram observados por outros autores ao empregar o protocolo recomendado pelo fabricante em amostras de carne e de ração animal, tendo sido necessária modificação no método para a obtenção de resultados precisos e confiáveis (Gompa, 2013; Horváth et al., 2022).

A complexidade da matriz do queijo, em função do alto conteúdo de gordura e proteínas, requer o desenvolvimento de métodos precisos de extração de micotoxinas, considerando as interações específicas entre as micotoxinas e os componentes estruturais da matriz (Cañás et al., 2023). A utilização de kits validados para o uso em matrizes diferentes do QMACFN exigiu esforço ainda maior para adequá-lo à matriz proposta, assegurando a confiabilidade dos dados analíticos obtidos.

Turner et al. (2009) afirmaram que a escolha do solvente extrator depende da estrutura química dos analitos e da matriz, sendo a extração afetada por diferentes misturas. Soluções extratoras compostas por misturas de diclorometano e acetato de etila têm se mostrado altamente eficientes na extração de micotoxinas em pesquisas com matrizes complexas como queijos e produtos cárneos (Manetta et al., 2005; Manetta et al., 2009; Jørgensen, Petersen, 2002; Gompa, 2013). No presente estudo a mistura de solventes diclorometano:acetato de etila (50:50, v/v) (Método E) proporcionou melhores taxas de recuperação para os analitos quando comparado aos ensaios prévios, sendo 99,33% para aflatoxina total e 99,87% para OTA. O diclorometano contribui para a redução de interferentes lipofílicos, enquanto o acetato de etila, com maior polaridade, permite a extração das toxinas polares (Gompa, 2013; Agriopoulou et al., 2020; Delmulle et al., 2006). De acordo com Anen et al. (2013), o metanol aquoso, que é comumente utilizado em kits comerciais, pode ser insuficiente para dissolver as micotoxinas em extratos. Conforme previamente descrito, considerando as fortes interações específicas entre as micotoxinas alvo e os componentes estruturais da matriz do queijo, vê-se a necessidade da utilização de outros solventes para a liberação das toxinas para as interações no ELISA.

O uso do hexano como solvente desengordurante do extrato (método E*) não mostrou grandes diferenças em relação à recuperação de aflatoxina total (94,33%) e da OTA (104,21%). Os resultados obtidos por esse ensaio corroboram aqueles encontrados por Braga et al. (2023), em que não foram observados efeitos significativos da utilização do hexano nas taxas de recuperação de micotoxinas em salsichas fermentadas. Por outro lado, o uso desse solvente na última etapa do preparo da amostra apresentou recuperações com menores variações entre as replicatas, o que se justifica, possivelmente, pela eficiência do hexano na separação de lipídios, devido à similaridade de polaridade, sem alterar de forma significativa a recuperação dos analitos.

O método de extração aplicado às amostras de queijo, utilizando solução extratora composta por diclorometano:acetato de etila (50:50, v/v) e etapa de desengorduramento em hexano (Método E*), que já havia demonstrado eficiência para o ELISA, foi posteriormente aplicado ao HPLC-FLD, apresentando excelente desempenho, com recuperações que variaram de 85% a 98%. Diante disso, o Método E* cuja combinação de solventes permitiu eficiente extração, foi submetido a análise de desempenho garantindo maior sensibilidade e precisão analítica nas etapas seguintes.

3.2. Validação dos métodos analíticos

A seletividade do método cromatográfico foi garantida, uma vez que os cromatogramas obtidos da análise da amostra branca e de uma amostra de queijo fortificada, analisadas pelo método HPLC-FLD, não apresentaram sinais de interferência no tempo de retenção ou próximo do tempo de retenção das micotoxinas investigadas. Na Figura 1 pode ser observado um cromatograma de uma amostra de queijo branco fortificada.

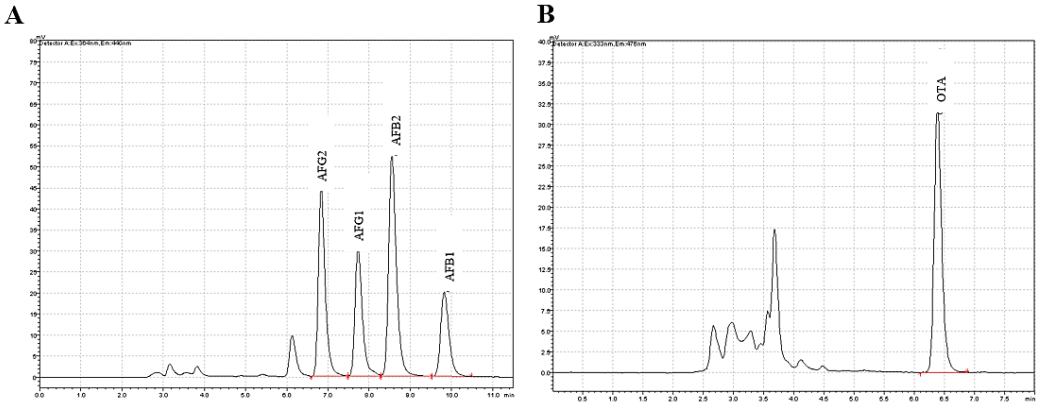


Figura 1- Cromatogramas HPLC-FLD de uma amostra de QMA branca fortificada com 9 µg/kg para aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (A) e 37,65 µg/kg para OTA (B).

Todas as curvas analíticas construídas pelo método HPLC-FLD demonstraram boa linearidade, com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 para todos os analitos, nas faixas de concentração estudadas, tanto para as curvas construídas em solvente, quanto para curvas construídas no extrato da matriz, confirmando todas as premissas do modelo de regressão linear. Os *outliers* detectados ficaram abaixo do limite recomendado de 20% dos dados originais, sugerindo que os valores discrepantes foram bem controlados no método aplicado, assegurando confiabilidade do modelo. A normalidade ($p>0,10$) e a independência dos resíduos ($p>0,05$) foram confirmadas para todos os analitos investigados. A variabilidade dos resíduos mostrou-se homogênea ($p>0,05$) para todos os analitos ao longo de todas as faixas de concentração analisadas, indicando uma distribuição

consistente e uniforme dos erros residuais em todas as concentrações avaliadas. Regressão significativa ($p<0,05$) e falta de ajuste não significativa ($p>0,05$) foram encontradas, atestando a linearidade de todas as curvas analíticas. Os parâmetros obtidos no teste de linearidade para método HPLC-FLD são mostrados na Tabela S1 (Material suplementar).

Diferenças significativas ($p<0,05$) foram observadas entre as interseções das curvas analíticas preparadas em solvente e em extrato da matriz para a todas as micotoxinas investigadas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA) (Tabela 3). Em relação às inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente e em extrato da matriz, diferenças significativas também foram observadas, indicando efeitos de matriz ($p>0,05$) na determinação dos analitos, exceto da OTA. Considerando os resultados obtidos, a quantificação das micotoxinas foi realizada empregando curvas matrizadas, assegurando confiabilidade nos resultados e garantindo que a resposta analítica da calibração refletisse as condições reais da amostra.

Table 3- Avaliação do efeito da matriz através de comparações entre as interseções e inclinações das curvas construídas em matriz com as curvas em solvente para cada analito.

Micotoxinas	Interseções		$t_{crítico}$	Inclinações	
	t	p		t	p
Aflatoxina B1	**7,95**	**0,00**	2,09	**38,10**	**0,00**
Aflatoxina B2	**30,02**	**0,00**	2,10	**11,58**	**0,00**
Aflatoxina G1	**2,52**	**0,02**	2,11	**22,40**	**0,00**
Aflatoxina G2	**3,19**	**0,00**	2,11	**19,87**	**0,00**
Ocratoxina A	**4,44**	**0,000**	2,03	1,64	0,110

Casos em que o efeito matriz foi confirmado estão destacados em negrito; p: p valor; t: estatística para comparações das interseções e inclinações das curvas em solvente e em matriz.

Os dados obtidos dos ensaios de exatidão e precisão pelos métodos ELISA e HPLC-FLD, tanto em condições de repetibilidade (RSD_r) quanto de precisão intermediária (RSD_R) são apresentados na Tabela 4. O método HPLC-FLD apresentou valores de recuperação que variaram de 84,60% a 108,77% para todos os analitos investigados. Pelo método ELISA, os valores de recuperação variaram entre 87,30% e 109,79%, indicando equivalência entre os métodos. Os resultados de recuperação obtidos por ambos os métodos analíticos atenderam os critérios de aceitabilidade, de 70% a 120%, para os dois níveis de concentração para as aflatoxinas e para a OTA (EC, 2023). Os valores de RSD_r e RSD_R foram inferiores a 6,37% para todas as micotoxinas investigadas pelo método cromatográfico. Esses desvios estão de acordo com as diretrizes europeia que estabelecem RSD menor que 20% em todos os níveis estudados (CE, 2023).

O método por ELISA, mostrou maiores valores de desvios padrão relativos, obtidos em condições de repetibilidade e precisão intermediária, em relação ao método HPLC-FLD. Jiang et al. (2021), que enfatizam que existem dois fatores principais que podem afetar a precisão do método ELISA. Durante cada ensaio, quaisquer substâncias presentes nas amostras podem ser adsorvidas à fase sólida (placa) devido à ligação não específica, causando alta leitura de fundo ou falso sinal. Em segundo lugar, a reação cruzada entre o anticorpo secundário marcado com enzima e o anticorpo de detecção pode comprometer a seletividade do ensaio, resultando em resultados imprecisos e irreprodutíveis. Verifica-se que, apesar de apresentar maiores valores de desvios relativos em comparação ao método HPLC-FLD, o método ELISA proposto para determinar aflatoxinas e ocratoxina em QMACFN apresentaram valores de RSD inferiores à 17,17% para todos os analitos, atendendo aos critérios de

aceitabilidade (Brasil, 2015; EC, 2023). Pelos resultados obtidos no presente estudo, ambos os métodos avaliados são capazes de determinar os analitos de forma confiável e consistente.

Tabela 4 - Parâmetros de validação dos métodos HPLC-FLC e ELISA para cada analito em dois níveis de fortificação.

Método	Micotoxinas	LD	LQ	Rec.	RSD_r	RSD_R	Rec.	RSD_r	RSD_R
				2 µg/kg			9 µg/kg		
HPLC-FLC	Aflatoxina B1	0,26	2,12	95,10	1,97	2,36	84,60	2,67	2,98
	Aflatoxina B2	0,25	2,09	102,06	1,78	2,67	91,74	2,61	3,09
	Aflatoxina G1	0,43	2,09	106,94	2,01	2,49	105,60	2,23	2,25
	Aflatoxina G2	0,26	2,11	108,77	1,96	2,68	105,41	2,19	3,78
	Ocratoxina A	0,11	2,11	5,02 µg/kg			37,65 µg/kg		
				84,80	2,98	5,93	89,90	3,10	6,37
ELISA	Aflatoxina total	3,00	7,99	7,99 µg/kg			37,67 µg/kg		
				109,79	9,70	9,70	87,30	17,17	17,17
	Ocratoxina A	1,90	5,02	5,02 µg/kg			37,65 µg/kg		
				100,29	16,07	16,07	90,65	11,63	11,63

LD: Limite de detecção (µg/kg); LQ: Limite de quantificação (µg/kg); Rec. (%): recuperação; RSD_r (%) e RSD_R (%): Desvio padrão relativo em condições de repetibilidade e de precisão intermediária (n=5), respectivamente.

De modo semelhante ao presente estudo, ao comparar o uso das técnicas de cromatografia líquida com detector de fluorescência com ELISA, Kos et al. (2016) observaram valores de recuperação entre 72,5% e 95,8% para a determinação de aflatoxina M1 em amostras de leite e RSD de 9,53 e 23,4% em condições de repetibilidade e de precisão intermediária, respectivamente, por HPLC-FLD. Por ELISA, desvios padrão relativos máximos de 6,43% e 17,8% foram obtidos, respectivamente, em condições de repetibilidade e de precisão intermediária. Ao comparar a aplicação de HPLC-FLD com ensaio imunoenzimático, Beyene et al. (2019) concluiu que as duas técnicas foram eficientes para determinar AFB1 em amostras de ração animal, entretanto maiores desvios em condições de repetibilidade (RSD_r=35%) foram observadas nos ensaios de precisão por ELISA, sugerindo a aplicação desse método apenas para triagem.

Os limites de quantificação estimados pelo método por HPLC-FLD, a partir da razão entre dez vezes o desvio padrão do intercepto e a inclinação da reta, mostraram-se abaixo das faixas lineares das curvas analíticas. Diante disso, assumiu-se os limites de quantificação do método como sendo os menores níveis de concentração das curvas analíticas construídas para as aflatoxinas e OTA. Os resultados indicaram valores de LQ de 2 µg/kg e de LD variando entre 0,11 µg/kg e 0,43 µg/kg para as micotoxinas avaliadas em QMACFN.

Dall'Asta et al. (2008) ao avaliar a presença de OTA em amostras de queijos Gorgonzola and Roquefort observou um LQ de 0,1 µg/kg e Kilicel et al. (2017) encontrou valores de LQ variando de 0,11 µg/kg (AFB1) a 0,14 µg/kg (AFG2) para queijos e outras matrizes. Ainda que os valores de LQ obtidos pelos autores citados tenham sido inferiores ao método proposto pelo presente trabalho, os procedimentos de extração aplicaram etapas de purificação com colunas de imunoafinidade, o que aumenta a complexidade e o custo dos métodos analíticos. Adicionalmente, pode-se considerar satisfatórios os valores obtidos pelo presente estudo, se considerarmos a escassez de legislações que estabeleçam limites para a presença de micotoxinas em QMACFN.

Atualmente, não existem limites regulamentados para a presença de OTA e aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) em queijos. Até o momento, apenas a Eslováquia, país membro da União Européia, estabeleceu um nível máximo de 5 µg/kg OTA em leite (Duarte et al., 2010) e, em relação às aflatoxinas, a legislação brasileira estabelece limite exclusivamente para AFM1 (2,5 µg/kg) em queijos de forma geral (Brasil, 2022). No regulamento da UE não há

limites estabelecidos para AFM1 em queijo, apenas em leite (0,05 µg/kg) destinado a fabricação de derivados (CE, 2006b). Utilizando outras matrizes como comparação, a UE estabelece limites máximos de 5 µg/kg e 10 µg/kg para a presença de OTA e Aflatoxinas totais em cereais e castanhas, respectivamente. Diante do exposto, o LQ encontrado neste estudo, para determinação de micotoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA) por HPLC-FLD foi menor que o limite estabelecido pela legislação (2,5 µg/kg) para AFM1.

Os limites de detecção e quantificação obtidos pelo método ELISA foram determinados com base na resposta média das concentrações obtidas nos ensaios com amostra branca, sendo, respetivamente, 5,26 µg/kg e 7,95 µg/kg para aflatoxina total e 3,21 µg/kg e 4,86 µg/kg para OTA. Cabe enfatizar que se trata do desenvolvimento de um novo método, ou seja, os kits empregados na otimização são comercializados para determinação de micotoxinas em grãos, nozes, cereais e ração animal, não tendo sido ainda aplicados em amostras de queijos, como também em QMACFN. Valores semelhantes foram reportados por Maragos (2022) na determinação da micotoxina roquefortina C em queijos azuis por ELISA, nos EUA, com LD = 1,8 µg/kg e LQ = 6,9 µg/kg.

A técnica ELISA é amplamente utilizada devido à sua sensibilidade e especificidade, mas a geração de resultados falso-positivos e falso-negativos tem sido reportada na literatura, sendo atribuída a fatores relacionados ao método e às condições experimentais (Terato et al., 2014). Falsos-positivos são relacionados principalmente à presença de compostos com estrutura química semelhante às micotoxinas, que podem levar a um sinal positivo mesmo na ausência do composto de interesse. Além disso, certas substâncias, como íons ferrosos, ácidos orgânicos e enzimas, podem destruir a atividade enzimática ou parte dela e, portanto, gerar um resultado falso-positivo. Resultados falso-negativos são principalmente relacionados à componentes da matriz que podem inibir a interação anticorpo-antígeno, reduzindo a real concentração do analito alvo (Laamanen, Veijalainen, 2009; Terato et al., 2014). Respostas quantificáveis foram determinadas no branco da matriz, tanto para OTA, 2,49 µg/kg, quanto para aflatoxina total, 4,11 µg/kg. Este fato, levou a obtenção de limites de detecção e quantificação acima do primeiro nível das faixas de concentração das curvas analíticas originalmente estabelecidas pelos kits empregados para determinação de aflatoxina total (LD= 3 µg/kg e LQ= 4 µg/kg) e OTA (LD= 1,9 µg/kg e LQ= 2 µg/kg). Em pesquisa semelhante, com objetivo de adaptar um kit de teste ELISA validado em outras matrizes para detecção de AFB1 em silagem de milho, Horváth et al. (2022) relataram uma concentração média em amostras brancas de 2,14 µg/kg, com LD de 2,44 µg/kg e LQ de 3,03 µg/kg.

A observação de valores quantificáveis para a amostra branca de queijo, indica a possibilidade de interferência da matriz. Laamanen e Veijalainen (2009), reportaram a presença de resultados falsos positivos durante a avaliação de tricotecenos em cereais e grãos, sendo que a verificação dos resultados por cromatografia gasosa mostrou que as reações eram falsas. Os autores associam este resultado à atividade de peroxidases endógenas presentes nos extratos das amostras, sedo que a lavagem realizada entre as etapas do ELISA não removeu completamente essas substâncias da placa de microtitulação. Além disso, os autores afirmam que, devido à alta sensibilidade dos ensaios ELISA, a interferência das amostras não gerou resultados falso-negativos. Embora o método por ELISA apresente algumas desvantagens, o mesmo foi considerado adequado para a triagem de tricotecenos em cereais e grãos.

Reações falsas positivas podem ser reduzidas ou distinguidas das respostas verdadeiras testando novamente os extratos em diferentes diluições (Horváth et al., 2022). Por outro lado, esta alternativa pode levar à diminuição da sensibilidade analítica. Conforme abordado anteriormente, os resultados obtidos por este estudo

refletem a adaptação de kits, originalmente desenvolvidos para outras matrizes, para uma matriz complexa como o QMACFN. Essa adaptação requer ajustes na metodologia que, embora possam impactar os limites alcançados, não invalidam o potencial do método ELISA na eficiente determinação das micotoxinas no QMACFN. Além disso, a inexistência de limites regulatórios estabelecidos para micotoxinas especificamente em queijos reforça a relevância dos resultados demonstrados por este estudo. Os valores obtidos por esse estudo, além de oferecer uma importante base para futuros estudos e discussões sobre a validação de métodos analíticos, também poderá contribuir para a definição de limites máximos permitidos de micotoxinas no QMACFN.

Os valores de LD e LQ obtidos pelo método ELISA foram superiores aos determinados pela técnica HPLC-FLD, o que pode ser atribuído à maior especificidade e sensibilidade do método cromatográfico, enquanto o ELISA, embora prático e amplamente utilizado, está sujeito a maior influência da matriz e limitações inerentes à sua metodologia. Tais resultados estão de acordo com pesquisas relacionadas que realizaram estudo comparativo entre métodos por HPLC-FLD e por ELISA (Omar et al., 2020; Kos et al., 2016).

Em síntese, o método de extração unificado otimizado para ser aplicado nas análises de micotoxinas por HPLC-FLD e ELISA, demonstrou eficiência satisfatória, com resultados obtidos pelas figuras de mérito em conformidade com os critérios de desempenho estabelecidos para validação de métodos analíticos e, portanto, fornece uma abordagem eficaz e confiável para monitoramento de micotoxinas em queijos Minas artesanal de casca florida natural.

3.3. Análise de ocorrência de micotoxinas em amostras reais de QMACFN

Os métodos validados foram aplicados à análise de 26 amostras de QMACFN, coletadas em diferentes regiões produtoras do estado de Minas Gerais, Brasil, para avaliar a presença das micotoxinas. No entanto, nenhuma das micotoxinas investigadas neste estudo foi determinada em concentrações acima do LQ, tanto pelo método ELISA quanto pelo método por HPLC-FLD. Vale mencionar que todas as amostras foram analisadas pelos métodos propostos foram também analisadas por um método UPLC-MS/MS (Artigo 2), com LQ de 1,9 µg/kg para todas as micotoxinas. Contudo, nenhuma das micotoxinas investigadas foi detectada nas amostras analisadas. A partir dos resultados obtidos, podemos confirmar os achados deste estudo, que indicam tanto a eficácia do método utilizado quanto a ausência de micotoxinas nas amostras de queijo analisadas. Esses achados reforçam a confiabilidade da abordagem adotada, podendo garantir a segurança das amostras quanto à presença de micotoxinas.

Apesar das diferenças observadas nas sensibilidades dos métodos validados, com base nos resultados obtidos pode-se notar que a performance do ELISA foi comparável à técnica HPLC-FLD. Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores que compararam a técnica ELISA com o método HPLC-FLD na quantificação de micotoxinas em diferentes matrizes (Colak et al., 2006; Omar et al., 2020; Zheng et al., 2005). Os autores concluíram que a técnica ELISA apresenta confiabilidade, sendo uma alternativa viável aos métodos cromatográficos, especialmente quando há limitação de acesso ao equipamento ou para se realizar triagem em casos de um grande número de amostras.

A ocorrência de micotoxinas em diferentes tipos de queijo maturados com fungos é bem relatada na literatura, com diferentes níveis de quantificação. Na Itália, Anelli et al. (2019) detectaram ocratoxina A em níveis altos, variando de 0,2 a 317,17 µg/kg em queijos maturados em cavernas. Em estudo recente, Marcelão et al. (2024) também relataram altas concentrações de ocratoxina A (de ND a >1000 µg/kg) em queijo Minas artesanal maturado

em caverna, no Brasil. O queijo de caverna é uma variedade de queijo maturado por fungos em sua superfície, com objetivo de explorar a população fúngica que ocorre naturalmente nas paredes da caverna, em busca da produção de atributos sensoriais únicos promovidos durante a maturação. Dessa forma são criadas condições favoráveis para o crescimento de diferentes tipos de fungos no queijo, incluindo os toxigênicos. Em contraste ao relatado anteriormente, baixa ocorrência de contaminação por OTA e aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) foram relatados por outros autores ao avaliar diferentes tipos de queijos. Altafani et al. (2021) detectaram presença de OTA em concentrações de 1,3 a 7,5 µg/kg em apenas 4 de 69 amostras de queijo, as demais apresentaram valores abaixo do LQ (1 µg/kg). Níveis não detectáveis de AFB1 e AFB2 foram reportados por Kilicel et al. (2017) ao pesquisarem aflatoxinas em amostras de queijos azuis. Tais autores observaram baixas concentrações de AFG1 (0,025 µg/kg) e AFG2 (0,306 µg/kg).

Embora o queijo seja um produto propício ao crescimento de fungos, isso não implica necessariamente a produção de micotoxinas. Diferentes fatores são responsáveis por modular a produção de micotoxinas, entre eles a capacidade intrínseca da espécie em produzir micotoxinas, as interações com outros microrganismos, bem como fatores de fabricação e ambientais associados, como temperatura, umidade relativa, tempo de maturação e composição do próprio queijo (teor de sal, pH e atividade da água) (Martin; Cotter, 2023; Hymery et al., 2014). Martin e Cotter (2023) citam que a produção de toxinas por cepas toxigênicas mais comumente encontrados em queijos artesanais ocorre em valores de atividade de água relativamente altos, entre 0,96 e 0,99, bem como em condições de baixos valores de pH (em torno de 5,0) e temperatura entre 25 e 30 °C para ativação de genes relacionados à produção de toxinas. O controle desses fatores pode prevenir a ocorrência de micotoxinas nos queijos. Nesse sentido, é necessário que sejam seguidas todas as boas práticas sanitárias e agropecuárias, garantindo condições adequadas produção e maturação desses queijos. Essas medidas contribuem para um ambiente menos favorável ao desenvolvimento de fungos toxigênicos, garantindo a segurança do produto final.

4. Conclusão

Os métodos otimizados e validados para a determinação de micotoxinas por ELISA e por HPLC-FLD, demonstraram conformidade com os critérios de validação, sendo eficazes para o monitoramento de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) e OTA em QMACFN. O kit de teste Elisa empregado nesse estudo foi aplicado com sucesso, pela primeira vez, na determinação de aflatoxina total e OTA nesse tipo de matriz. Considerando a complexidade da amostra, apesar de diferenças na sensibilidade, os métodos apresentaram desempenho comparável, com o ELISA destacando-se como alternativa viável para triagem de aflatoxinas e OTA, devido à simplicidade e custo reduzido.

Nenhuma micotoxina foi detectada nas amostras analisadas, o que indicando eficácia nas condições de produção do QMACFN, adotadas pelos produtores, com consequente segurança para o consumo. Entretanto, é fundamental que o monitoramento contínuo desses produtos seja mantido, devido ao potencial risco de contaminação por fungos toxigênicos associado ao ambiente de maturação e às condições de processamento dos queijos artesanais.

Estudo dessa natureza contribuem para o estabelecimento de ferramentas confiáveis para a determinação de micotoxinas, auxiliando na garantia da segurança alimentar e no suporte ao estabelecimento de regulamentação de limites máximos permitidos para esses contaminantes em queijos, incluindo o QMACFN.

Agradecimentos

Os autores agradecem Laboratório de Micotoxinas da Fundação Ezequiel Dias pela parceria na realização deste trabalho. Os autores também agradecem aos produtores de queijo Minas artesanal do estado de Minas Gerais, Brasil, pelo fornecimento de amostras.

Contribuição do autor

Fabiana Regina Lima: Conceitualização, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Recursos, Software, Papéis/Escrita - rascunho original**; Fabiana Reinis Franca Passamani:** Recursos, Curadoria de dados, Software, Escrita - revisão e edição; **Rafael von Sperling de Souza:** Conceitualização, Investigação, Metodologia, Software, Escrita - revisão e edição; **Fabiano Narciso Paschoal:** Conceitualização , Investigação, Metodologia, Software, Escrita - revisão e edição; **Raquel Eduardo Bickel:** Análise formal, Metodologia, Escrita - revisão e edição; **Mariana de Oliveira Almeida**: Metodologia e Escrita - revisão e edição; **Elisângela Jaqueline Magalhães**: Conceitualização, Curadoria de dados, Metodologia e Escrita - revisão e edição**; Luís Roberto Batista**: Conceitualização, Captação de recursos, Administração de projetos, Supervisão.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Disponibilidade de Dados

Os dados serão disponibilizados mediante solicitação.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes ou relacionamentos pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

Dados suplementares

Dados suplementares para este artigo podem ser encontrados online.

Referências

Abraxis. (2024). Mycotoxins ELISA. Disponível em: https://www.goldstandarddiagnostics.us/home/products/rapid-test-kits/mycotoxins/mycotoxin-elisa-kits/. Acesso em: 12 nov. 2024.

Achenef, B., Du, X., Schrunk, D., Ensley, S., & Rumbeiha, W. (2019). High-performance liquid chromatography and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay techniques for detection and quantification of aflatoxin B1 in feed samples: A comparative study. *BMC Research Notes*, 12(1), Article 10. https://doi.org/10.1186/s13104-019-4538-z

Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods*, 9(2), Article 137. https://doi.org/10.3390/foods9020137

Altafini, A., Roncada, P., Guerrini, A., Minkoumba Sonfack, G., Fedrizzi, G., & Caprai, E. (2021). Occurrence of ochratoxin A in different types of cheese offered for sale in Italy. *Toxins*, 13(8), Article 540. https://doi.org/10.3390/toxins13080540

Anelli, P., Freppaz, M., Gullino, M. L., & Cocolin, L. (2019). Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. *Food Microbiology*, 78, 62–72. https://doi.org/[link se disponível]

AOAC International (2012). Official Methods of Analysis of AOAC International (19th ed.). Maryland: AOAC International.

Braga, D. E., de Souza, R. V. S., Paschoal, F. N., Bickel, R. E., Lima, D. P., Gonçalves, J. E., & Gloria, M. B. A. (2023). Determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 and ochratoxin A in dry fermented sausages using a dilute and shoot method and LC–MS/MS. Food Analytical Methods, 16, 1437–1445. https://doi.org/10.1007/s12161-023-02511-7

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2015). Manual de garantia da qualidade analítica: Áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2022). Instrução Normativa - IN nº 160, de 1° de julho de 2022. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Diário Oficial da União, nº 126.

Cañás, et al. (2023). Detection of mycotoxins in cheese using an optimized analytical method based on a QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS quantification. *Food Chemistry*, 408, Article 135182. https://doi.org/[link se disponível]

Colak, H., Bingol, E. B., Hampikyan, H., & Nazli, B. (2006). Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis*, 14(3), Article 12. https://doi.org/10.38212/2224-6614.2476

Dall'Asta, C., De Dea Lindner, J., Galaverna, G., Dossena, A., Neviani, E., & Marchelli, R. (2008). The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chemistry*, 106(2), 729–734. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.049

Delmulle, B., De Saeger, S., Adams, A., De Kimpe, N., & Van Peteghem, C. (2006). Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins on cellulose filters and in fungal cultures. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(5), 771–776.

Duarte, S. C., Lino, C. M., & Pena, A. (2010). Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: A review of the worldwide status. Food Additives & Contaminants: Part A, 27(10), 1440–1450. https://doi.org/10.1080/19440049.2010.497166

EC (2023). Comissão Europeia. Regulamento de Implementação da Comissão (EU) 2023/2782, de 11 de dezembro de 2023. Laying down the methods of sampling and analysis for the control of the levels of mycotoxins in food.

EC (2002). Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). *Official Journal of the European Communities*. https://data.europa.eu/eli/dec/2002/657/oj

EC (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L, 255, 14–17.

Eça, R. G. M., et al. (2022). Queijo Minas Artesanal: Gosto e território. Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial (SENAC). Belo Horizonte: Senac Minas.

Gompa, L. (2013). Ochratoxin A: Evaluation of methodologies for determination of ochratoxin A in food commodities, contamination levels in different products available in the US market and evaluation of fungal microbiota associated with some of the products (Master's thesis). University of Nebraska.

Horváth, E., Pusztahelyi, T., Adácsi, C., Tanyi, E., & Pócsi, I. (2022). Optimization and validation of ELISA for aflatoxin B1 detection in fermented forages and feeds. *Scientifica* (Cairo), 2022, Article 6059880. https://doi.org/10.1155/2022/6059880

Hymery, N., Vasseur, V., Coton, E., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G., & Coton, M. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 437–456.

Jiang, X., Wu, M., Albo, J., & Rao, Q. (2021). Non-specific binding and cross-reaction of ELISA: A case study of porcine hemoglobin detection. *Foods*, 10(8), Article 1708. https://doi.org/10.3390/foods10081708

Jørgensen, K., & Petersen, A. (2002). Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. *Food Additives & Contaminants*, 19(6), 562–567. https://doi.org/10.1080/02652030110113807

Kilicel, F., Karapinar, H. S., & Cimen, A. (2017). Quantitation of aflatoxins in food materials using HPLC-FLD method. *Science Journal of Analytical Chemistry*, 5(6), 90–97. https://doi.org/10.11648/j.sjac.20170506.11

Kos, J., Janić Hajnal, E., Jajić, I., Krstović, S., Mastilović, J., Šarić, B., & Jovanov, P. (2016). Comparison of ELISA, HPLC-FLD, and HPLC-MS/MS methods for determination of aflatoxin M1 in naturally contaminated milk samples. *Acta Chimica Slovenica*, 63(4), 747–756. https://doi.org/10.17344/acsi.2016.2451

Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health, and their management. *Frontiers in Microbiology*, 17(7), Article 2170.

Laamanen, I., & Veijalainen, P. (2009). Factors affecting the results of T-2 mycotoxin ELISA assay. *Food Additives & Contaminants*, 9(4), 337–343. https://doi.org/10.1080/02652039209374079

Lin, J. F., Chang, K. L., Hsieh, B. S., Hu, Y. C., Huang, E. S., & Yu, H. S. (2024). Development of validated sandwich ELISA for detecting peanut allergen Ara h 3 in food. *Food Chemistry*, 445, Article 138757. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138757

Manetta, A. C., Di Giuseppe, L., Giammarco, M., Fusaro, I., Simonella, A., Gramenzi, A., & Formigoni, A. (2005). High-performance liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M1 in milk and cheese. *Journal of Chromatography A*, 1083(1–2), 219–222.

Manetta, A. C., Giammarco, M., Di Giuseppe, L., Fusaro, I., Gramenzi, A., Formigoni, A., Vignola, G., & Lambertini, L. (2009). Distribution of aflatoxin M1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry*, 113(2), 595–599. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.091

Marcelão, C. V. P., et al. (2024). Unveiling ochratoxin A and ochratoxigenic fungi in Brazilian artisanal cheeses: Insights from production to consumption. *Food Research International*, 183, Article 114214.

Martin, J. G. P., & Cotter, P. D. (2023). Filamentous fungi in artisanal cheeses: A problem to be avoided or a market opportunity? Heliyon, 9(4), Article e15110. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15110

Martin, J. G. P., et al. (2023). Seasonal variation in the Canastra cheese mycobiota. *Frontiers in Microbiology*, 13, Article 5437.

Minas Gerais. Instituto Mineiro de Agropecuária. (2024). Portaria Nº 2307, de 12 de junho de 2024. Estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural. Belo Horizonte: IMA.

Omar, S. S., Haddad, M. A., & Parisi, S. (2020). Validation of HPLC and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) techniques for detection and quantification of aflatoxins in different food samples. *Foods*, 9(5), Article 661. https://doi.org/10.3390/foods9050661

Oplatowska-Stachowiak, M., Kleintjens, T., Sajic, N., Haasnoot, W., Campbell, K., Elliott, C. T., & Salden, M. (2017). T-2 Toxin/HT-2 Toxin and Ochratoxin A ELISAs: Development and in-house validation in food in accordance with Commission Regulation (EU) No 519/2014. *Toxins,* 9(12), Article 388. https://doi.org/10.3390/toxins9120388

Pineda, A. P. A., et al. (2021). Brazilian artisanal cheeses: Diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 732. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33959118/

R-Biopharm. (2024). ELISA. Disponível em: https://food.r-biopharm.com/analytes/mycotoxins/. Acesso em: 12 nov. 2024.

Romer Labs. (2024). Mycotoxins. Disponível em: https://www.romerlabs.com/en/shop/mycotoxins/. Acesso em: 12 nov. 2024.

Souza, S. V. C., Pinto, C. T., & Junqueira, R. G. (2007). In-house method validation: Application in arsenic analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 241–247. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.09.002

Souza, T. P., et al. (2021). Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. *International Dairy Journal*, 120, Article 105085.

Terato, K., Do, C. T., Cutler, D., Waritani, T., & Shionoya, H. (2014). Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases. *Journal of Immunological Methods*, 407, 15–25. https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.03.013

Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835–855.

Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 168–180. https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010

UNESCO. Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura. (n.d.). Traditional ways of making Artisan Minas Cheese in Minas Gerais. Disponível em: https://ich.unesco.org/en/RL/traditional-ways-of-making-artisan-minas-cheese-in-minas-gerais-02102. Acesso em: 14 dez. 2024.

Zheng, Z., Humphrey, C., King, R., & Richard, J. (2005). Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC. *Mycopathologia*, 159, 255–263. https://doi.org/10.1007/s11046-004-8666-0

Material suplementar

Tabela S1- Parâmetros obtidos do teste de linearidade para as curvas produzidas em solvente e em matriz para método HPLC-FLC.

Micotoxina	Solvente				Matrizada		
	Faixa linear (ng/mL)	Equação linear	R^2	N	Equação linear	R^2	N
Aflatoxina B1	0,425-2,550	y = 259343x + 616.12	0,999	15	y = 181535x - 26832	0,998	18
Aflatoxina B2	0,419-2,515	y = 488336x - 1001.6	0,999	17	y = 398614x - 36745	0,998	18
Aflatoxina G1	0,419-2,514	y = 274160x - 27.128	0,999	15	y = 198747x - 16265	0,995	18
Aflatoxina G2	0,421-2,531	y = 90651x + 2857.6	0,999	14	y = 267120x - 17133	0,998	18
Ocratoxina A	0,421-2,530	y = 42959x - 386.89	0,999	17	y = 42537x - 2274.5	0,999	18

R^2 = coeficiente de determinação; N = número de observações após tratamento de *outlier.*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que a micobiota, embora adaptada ao ambiente de produção, apresenta variações na diversidade de espécies fúngicas associadas às condições ambientais sazonais. Durante a estação chuvosa, foi observada maior diversidade de espécies tanto no queijo quanto nas tábuas de maturação, indicando o impacto direto da temperatura e da umidade relativa no ecossistema microbiano.

G. candidum, *D catenulata* e *K. lactis* foram as espécies mais predominantes em todas as amostras de casca e massa dos queijos produzidos ao longo das duas estações do ano. Nas tábuas de maturação estiveram presentes espécies como *A. sydowii*, *A. versicolor*, *G. candidum* e *D. catenulata* durante a estação chuvosa, já no período de estiagem estivem presentes *G. candidum*, *D. catenulata, K. ohmeri, C. cladosporioides* e *Acremonium* sp. Em relação à caracterização físico-química dos queijos, foi observada influência da época no ano, destacando os parâmetros teores de gordura e atividade de água.

Os métodos otimizados e validados, baseados em UPLC-MS/MS, HPLC-FLD e ELISA, para a determinação de micotoxinas no QMACFN demonstraram conformidade com os critérios de validação, sendo eficazes para o monitoramento de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) e OTA nas amostras. O kit de teste ELISA empregado nesse estudo foi aplicado com sucesso, pela primeira vez, na determinação de aflatoxina total e OTA nesse tipo de matriz. Considerando a complexidade da amostra, apesar de diferenças na sensibilidade, os métodos apresentaram desempenho comparável, com o ELISA destacando-se como alternativa viável para triagem de aflatoxinas e OTA, devido à simplicidade e custo reduzido.

Nenhuma micotoxina foi detectada nas amostras de QMACFN obtidas de diferentes regiões do estado, indicando boas condições de produção do QMACFN, adotadas pelos produtores. Entretanto, é fundamental que o monitoramento contínuo desses produtos seja mantido, devido ao potencial risco de contaminação por fungos toxigênicos associado ao ambiente de maturação e às condições de processamento dos queijos artesanais.

Dessa forma, este estudo contribui significativamente para a preservação da qualidade e segurança do QMACFN, servindo de base para a definição de regulamentações específicas sobre limites máximos toleráveis para esses contaminantes no produto.

APÊNDICE A – Banners entregues aos produtores de Queijo Minas Artesanal da região da Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

APÊNDICE B - Cartilha disponibilizada aos produtores de Queijo Minas Artesanal.