



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Centro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CCQA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

CAIO VINICIUS PEREIRA MARCELÃO

**MICROBIOTA E OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A EM QUEIJOS
ARTESANAIS**

CAMPINAS

2023

CAIO VINICIUS PEREIRA MARCELÃO

**MICROBIOTA E OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A EM QUEIJOS
ARTESANAIS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluno: Caio Vinicius Pereira Marcelão

Orientador: Marta Hiromi Taniwaki

Co-orientador: Patrícia Blumer Zacarchenco
Rodrigues de Sá

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno Caio Vinicius Pereira Marcelão e orientada pelo Prof(a). Dr(a). Marta Hiromi Taniwaki.

CAMPINAS

2023

Agências: O presente trabalho foi realizado com financiamento da **FAPESP Nº do proc.: 2022/10378-0; 2021/07937-4; 2017/50349-0** e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO ITAL

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL

M314m Marcelão, Caio Vinicius Pereira.

Micobiota e ocorrência de ocratoxina A em queijos artesanais. / Caio Vinicius Pereira Marcelão. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: Ital, 2023.

49 f.

Orientadora: Dra. Marta Hiromi Taniwaki.

1. Queijo artesanal. 2. Fungos. 3. Ocratoxina. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Taniwaki, Marta Hiromi. III. Título.

Título em inglês: Mycobiota and occurrence of ochratoxin A in artisanal cheeses

Key- words: Artisanal cheese, fungi, ochratoxin A.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Marta Hiromi Taniwaki – Orientadora

Fabiana Aparecida Couto – Titular

Mariana Correa de Souza – Titular

Beatriz Thie Iamanaka – Suplente.

Data da Defesa: 13 de junho de 2023.

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Caio Vinicius Pereira Marcelão, aprovada pela Comissão Julgadora em 13/06/2023.

Prof.(a) Dr.(a) Marta Hiromi Taniwaki
ITAL - (Presidente)

Prof.(a) Dr.(a) Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá
ITAL - (co-orientador)

Dr.(a) Fabiana Aparecida Couto
IFMG (titular)

Dr.(a) Mariana Corrêa de Souza
ITAL (titular)

Dr.(a) Beatriz Thie Iamanaka
ITAL (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe pelo apoio, suporte e orientação nos momentos mais difíceis, além do incentivo para ir em busca do objetivo de fazer o mestrado.

Às professoras. Dra. Marta Hiromi Taniwaki e Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco, pelo privilégio de ter a orientação e co-orientação, pelo ensinamentos, conhecimento compartilhado, apoio, paciência, confiança e dedicação durante o desenvolvimento do projeto, além da oportunidade de realizar este trabalho.

À agência Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por viabilizar o acontecimento desse projeto e pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, a todos os professores que o compõem, por todo apoio e dedicação.

Agradeço também aos profissionais do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), ao Centro de Qualidade e Ciência de Alimentos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (CCQA) e ao Centro de Tecnologia de Laticínios e Bactérias Láticas (TECNOLAT) que colaboraram comigo durante a rotina de laboratório, conhecimento e utilização dos espaços para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço também aos produtores de queijos artesanais da região da Serra da Canastra e de São Paulo pelo carinho, alegria e receptividade com que nos acolheram durante o processo de coleta.

Aos meus amigos, especialmente minhas amigas Juliana Espindola e Mariana Correa pelo companheirismo, incentivo e ajuda nos momentos mais difíceis.

RESUMO

O Brasil é o quarto maior produtor de queijos do mundo, sendo o estado de Minas Gerais, uma das principais regiões de produção de queijo do país, incluindo os artesanais. Os queijos artesanais brasileiros são produzidos seguindo protocolos e tradições de cada região de produção, podendo ser produzidos com leite cru recém ordenhado, sem tratamento térmico ou leite pasteurizado, com adição de fermento natural (pingo); com inserção de culturas starters, com crescimento fúngico aparente (casca florida) ou com processo de raspagem (toilet) e lavagem da parte externa, além de diferentes tempos de maturação em ambientes, como salas de maturação e cavernas, dependendo de seu local de produção e legislações locais vigentes. As condições de maturação podem variar, proporcionando assim queijos artesanais com distintas microbiotas caracterizadas pelo ambiente e localização da região onde ocorreu a maturação. O queijo artesanal por ser produzido de diversas formas, é caracterizado como um produto de alto risco de contaminação por microrganismos, incluindo os fungos produtores de micotoxinas. No Brasil, não existe uma legislação que regule e determine os níveis aceitáveis de Ocratoxina A (OTA) em queijos. Desta forma, o presente trabalho de tese teve como objetivo investigar a ocorrência de fungos toxigênicos e a presença de ocratoxina A (OTA), no queijo artesanal brasileiro. Foi avaliado um total de 70 amostras. Nas amostras que apresentaram uma baixa contagem de bolores, a OTA foi analisada em uma parte única, enquanto nas amostras com alta contagem, a amostra foi dividida em 2 partes, a parte externa (casca) e a parte interna, que foram avaliadas separadamente. A extração foi realizada com acetonitrila e solução de bicarbonato de sódio. Uma alíquota foi passada através da coluna de imunoafinidade (IAC) específica para OTA. A detecção e a quantificação da OTA foram efetuadas em HPLC-FLD. Foram obtidos teores de OTA na faixa de <math><0,2</math> a $9,4$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ para os queijos avaliados em parte única e <math><0,2</math> $\mu\text{g}/\text{kg}$ a >1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para os queijos analisados em 2 partes, sendo esses valores encontrados tanto na casca quanto na parte interna dos queijos, mostrando que a ocorrência de OTA em queijos artesanais brasileiros é preocupante, em especial os maturados em cavernas. Mais estudos são necessários para se ter um melhor diagnóstico da presença dessa toxina nesses produtos e a melhor forma de minimizar a ocorrência da OTA durante a fabricação para garantir a segurança do consumidor.

Palavras-chave: Queijo artesanal; fungos, Ocratoxina A.

ABSTRACT

Brazil is the fourth largest cheese producer in the world, with the state of Minas Gerais being one of the main cheese production regions in the country, including artisanal cheese. Brazilian artisanal cheeses are produced following the protocols and traditions of each production region, and can be produced with freshly sorted raw milk, without heat treatment or pasteurized milk, with the addition of natural yeast (pingo); with the insertion of starter cultures, with apparent fungal growth (flowering bark) or with the scraping process (toilet) and washing of the external part, in addition to different shelf times in environments such as shelter rooms and caves, depending on the place of production and current local regulations. Harmonization conditions may vary, thus providing artisanal cheeses with distinct microbiota characteristics due to the environment and location of the region where harmonization took place. Because artisanal cheese is produced in different ways, it is characterized as a product with a high risk of contamination by microorganisms, including mycotoxin-producing fungi. In Brazil, there is no legislation that regulates and determines the acceptable levels of Ochratoxin A (OTA) in cheeses. Thus, the present project aimed to investigate the occurrence of toxigenic fungi and the presence of ochratoxin A (OTA) in Brazilian artisanal cheese. A total of 70 samples were evaluated. In samples that had a low mold count, the OTA was analyzed in a single part, while in samples with a high count, the sample was divided into 2 parts, the outer part (bark) and the inner part, which were evaluated separately. Extraction was performed with acetonitrile and sodium bicarbonate solution. An aliquot was passed through the immunoaffinity column (IAC) specific for OTA. The detection and quantification were performed on HPLC-FLD. OTA levels were obtained in the range of < 0.2 to 9.4 µg/kg for the cheeses evaluated in a single part and in the range of < 0.2 µg/kg to >1000 µg/kg for the cheeses analyzed in 2 parts, with these values found both in the rind and in the inner part of the cheeses, showing that the occurrence of OTA in Brazilian artisanal cheeses is of concern, especially those matured in caves. More studies are needed to have a better diagnosis of the presence of these toxins in these products and the best way to minimize the occurrence of OTA during manufacturing to ensure consumer safety.

Key words: artisanal cheese; fungi; Ochratoxin A.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
3.1 Produção de queijos artesanais no Brasil.....	2
3.1.1 Produção na Serra da Canastra – MG	3
3.1.2 Produção em São Paulo.....	5
3.2 Legislação de queijos artesanais.....	6
3.2.1 Legislação mineira.....	6
3.2.2 Legislação paulista	7
3.3 Queijos Maturados em Cavernas	8
3.4 Microbiota de queijos artesanais	9
3.5 Doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil (DTHA).....	10
3.6 Micotoxinas encontradas nos queijos.....	11
3.6.1 Ocratoxina A (OTA).....	13
3.7 Fatores que afetam a produção de micotoxinas em queijos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Amostragem	16
4.2 Análise micológica.....	16
4.3 Identificação morfológica dos fungos e análise da capacidade toxigênica.17	
4.4 Identificação molecular das cepas de <i>Aspergillus</i> produtores de OTA. 17	

4.5	Otimização da metodologia para análise de OTA por HPLC.....	18
4.6	Extração e quantificação de ocratoxina A dos queijos.....	18
4.7	Análise de gordura	19
4.8	Análise estatística.....	19
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1	Determinação da atividade de água (Aw) e análise micológica.....	19
5.2	Identificação morfológica	22
5.2.1	<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> em 3 diferentes meios de cultura	24
5.3	Otimização da metodologia para análise de OTA por HPLC.....	25
5.4	Análise de ocratoxina A (OTA) nas amostras de queijo.....	29
5.5	Análise da produção de ocratoxina A (OTA) em meio YESA.....	32
5.6	Caracterização dos representantes das cepas de <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	33
5.7	Análise de gordura	36
5.8	Análise variância (ANOVA).....	38
6.	CONCLUSÕES	40
7.	REFERÊNCIAS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Fluxograma de produção do queijo Canastra	4
Figura 2	- Estrutura química da Ocratoxina A (OTA).	14
Figura 3	- Esquema da análise de Diluição Seriada	17
Figura 4	- Queijos artesanais coletados na Serra da Canastra, MG e em Amparo, SP.....	20
Figura 5	- Total de fungos e a representação dos maiores grupos isolados	23
Figura 6	- Percentual de <i>A. Section Circumdatti</i> dentro do total de <i>Aspergillus</i> isolados.	23
Figura 7	- Correlação fungos isolados e locais de coleta das amostras.....	24

Figura 8 - Cepa de <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> . Ordem dos meios esq. para dir. YESA, MEA e CYA.....	25
Figura 9 - Análise de microscopia onde a cepa de <i>Penicillium</i> (esquerda) e a cepa de <i>Aspergillus</i> (direita).	25
Figura 10 - Relação amostras contaminadas e não contaminadas em relação ao total de 70 amostras coletadas.	30
Figura 11 - Relação amostras contaminadas e não contaminadas coletadas na Serra da Canastra - MG	30
Figura 12 - Relação amostras contaminadas e não contaminadas coletadas em São Paulo	31
Figura 13 - Relação amostras contaminadas e não contaminadas coletadas no comércio	31
Figura 14 - Queijos armazenados em cavernas (“cave cheese”).....	32
Figura 15 - Detecção de OTA na amostra 266 (A), e do padrão de OTA (B). 33	
Figura 16 - Árvore Filogenética	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência de micotoxinas em queijos de várias partes do mundo	13
Tabela 2 - Atividade de água (aw) e contagem total de bolores e leveduras nas amostras de queijos artesanais da Serra da Canastra e São Paulo.	20
Tabela 3 - Parâmetros de otimização comparando as metodologias descritas.	26
Tabela 4 – Segundo teste para otimização do método de extração de OTA....	27
Tabela 5 - Terceiro teste para otimização do método de extração de OTA.....	28
Tabela 6 - Ocorrência de ocratoxina A (OTA) nas amostras de queijos artesanais da Serra da Canastra e São Paulo.	29
Tabela 7 - Detecção da produção de ocratoxina A (OTA) no meio YESA.....	33
Tabela 8 - Cepas representantes analisadas molecularmente	34
Tabela 9 - Teor de gordura das amostras e suas respectivas classificações.	36
Tabela 10 - Dados de OTA por fazenda.....	39
Tabela 11 - Análise de ANOVA	39

1. INTRODUÇÃO

O queijo é considerado um alimento nutricionalmente rico, devido aos valores significativos de proteínas, cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio, vitaminas e lipídeos (FOX et al., 2004). De acordo com Resende (2010), há no mundo mais de 1.000 variedades de queijos. E em relação a produção, o Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial de produção anual de queijos, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, Alemanha e França. São produzidas cerca de 1,2 milhões de toneladas por ano, um mercado que movimenta, só na indústria, cerca de R\$ 22 bilhões no país (ABRAS, 2019; SORIO, 2018)

O queijo de modo geral é suscetível a contaminação indireta através de microrganismos contidos no leite ou direta quando em contato com o produto acabado, podendo ser microrganismos deteriorantes, patogênicos ou produtores de micotoxinas (FOX et al., 2004; VAN EGMOND; PAULSCH, 1986). Estima-se que no mundo, anualmente, uma em cada 10 pessoas adoecerá devido ao consumo de algum alimento contaminado (BRASIL, 2020).

Existe uma escassez de estudos onde foi avaliado de maneira ampla a contaminação de micotoxinas em queijos, em especial os queijos artesanais brasileiros e a avaliação da sua microbiota (HYMERY et al., 2014; MARTIN et al., 2023). Portanto, algumas questões sobre a produção e controle de micotoxinas em queijos artesanais brasileiros, assim como seus impactos ambientais, econômicos e na saúde do consumidor ainda necessitam de maiores esclarecimentos.

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar possíveis fontes de contaminações por ocratoxina A em queijos artesanais produzidos na região da Serra da Canastra – MG, de São Paulo e do comércio, através de métodos de identificação, quantificação e classificação de fungos e a ocorrência de ocratoxina A.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente projeto foram:

- Investigar a ocorrência de fungos filamentosos nas amostras de Queijos Artesanais da região da Serra da Canastra e de São Paulo durante a maturação, estocagem e comércio;
- Verificar a ocorrência das cepas de *Aspergillus section Circumdati* potencialmente produtoras de ocratoxinas;
- Analisar a presença de ocratoxina A nas amostras de queijos artesanais, da região da Serra da Canastra e de São Paulo durante a maturação, estocagem e comércio;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de queijos artesanais no Brasil

A produção de queijos artesanais no Brasil tem uma grande importância socioeconômica, cultural e alimentar, tendo atingido um volume de 1,2 milhão de toneladas de queijo produzidos no Brasil em 2020, sendo o estado de Minas Gerais um dos maiores produtores destes tipos de queijos no país, produzindo cerca de 40% do volume nacional ((ASCOM; EMATER-MG, 2022).

Os queijos artesanais são uma fonte de renda para cerca de 27 mil produtores, nas 3,3 mil agroindústrias de Queijo Minas Artesanal presentes no estado de Minas Gerais (ASCOM; EMATER-MG, 2022; SILVA et al., 2011).

A produção nacional de queijos artesanais foi iniciada na época do período de instalação dos imigrantes portugueses no Brasil, por volta dos anos 1500, com a chegada de gado trazidos da região da Serra da Estrela, em Portugal. Acredita-se que foi no decorrer do povoamento das terras mineiras pelos imigrantes que o conhecimento da forma de manufatura destes queijos disseminou-se pelo estado de Minas Gerais, onde trabalhadores portugueses iniciaram a produção de queijos artesanais, utilizando a tradição portuguesa de fabricação artesanal de queijos com leite bovino cru, coalho e a adição de partes do estômago de animais (RESENDE, 2010; CASTRO, 2015; SERTÃO BRÁS, 2017).

Com o decorrer do tempo a produção de queijos artesanais ganhou força e importância econômica no estado de Minas Gerais e em outros locais do país (PIRES, 2013; PINEDA et al., 2021).

O estado de Minas Gerais tem 10 regiões tradicionalmente conhecidas como produtoras de Queijos Artesanais, sendo elas as regiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Ibitipoca, Serra do Salitre, Serro, Triângulo, Diamantina e Entre Serras da Piedade ao Caraça (SOBRAL et al., 2022)

Dentre as regiões produtoras de queijo artesanal no estado de Minas Gerais, uma das mais conhecidas é a região da Serra da Canastra, região essa que contém certificação de origem para seus queijos e é uma das regiões produtoras de queijo brasileira mais conhecidas pelo Brasil e no mundo (NETTO, 2011).

3.1.1 Produção na Serra da Canastra – MG

A região da Serra da Canastra, que inclui os municípios de Bambuí, Córrego D'Anta, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, São Batista da Glória, Vargem Bonita e Tapiraí é uma das regiões mais conhecidas como sendo produtora de Queijo Minas Artesanal (QMA) do Brasil (ALMEIDA; FERNANDES, 2004; MINAS GERAIS, 2018). Estes nove municípios têm registro nacional com certificação de origem geográfica de sua produção, sendo que o Queijo Canastra foi reconhecido pelo INPI (Instituto Nacional de Proteção Industrial) sob o número IG201002 (ANDRADE et al., 2017). A produção do QMA da Serra da Canastra foi reconhecida pelo IPHAN (Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional) como patrimônio cultural e imaterial brasileiro (IPHAN, 2014).

A produção queijeira artesanal da região da Canastra é a principal fonte de renda para muitas famílias da região, sendo, portanto, uma atividade de grande importância socioeconômica e cultural (ALMEIDA; FERNANDES, 2004). Segundo o IMA (Instituto Mineiro Agropecuário), as vendas dos produtores regularizados desta região atingem, aproximadamente, 81.250 unidades por dia, estimando-se em mais de 700 produtores locais que trabalham sem registro no IMA (CAMPOS, 2020).

Os queijos artesanais mineiros têm ganhado destaque no cenário nacional e internacional, pois nos últimos anos, os queijos mineiros e paulistas têm

colecionado premiações, dentro e fora do território nacional (MINAS GERAIS, 2022).

A produção de queijo artesanal da região da Serra da Canastra – MG foi descrita pela Associação dos produtores de queijo canastra (APROCAN, 2011). Esta Associação estabeleceu através do regulamento de uso de indicação de procedência Canastra, para o Queijo Minas Artesanal, as etapas a serem seguidas que são: (1) obtenção da matéria prima, podendo ser através de ordenha mecânica ou manual, (2) processo de filtragem para a eliminação de partículas indesejáveis, (3) adição do fermento endógeno, popularmente conhecido como “Pingo”, (4) adição do coalho para a promoção do processo de coagulação, (5) após a coagulação a massa é cortada com auxílio de pás ou liras e seguida (6) da etapa de mexedura da massa para a remoção do soro (dessoramento), (7) enformagem que consiste em colocar a massa de queijos em formas, (8) prensagem manual para que o queijo ganhe seu formato, (9) salga onde é adicionado sal grosso nas partes superficiais do queijo e o processo de maturação de acordo com o tempo determinado em prateleiras de madeira conforme as etapas descritas na Figura 1 abaixo (APROCAN, 2011).

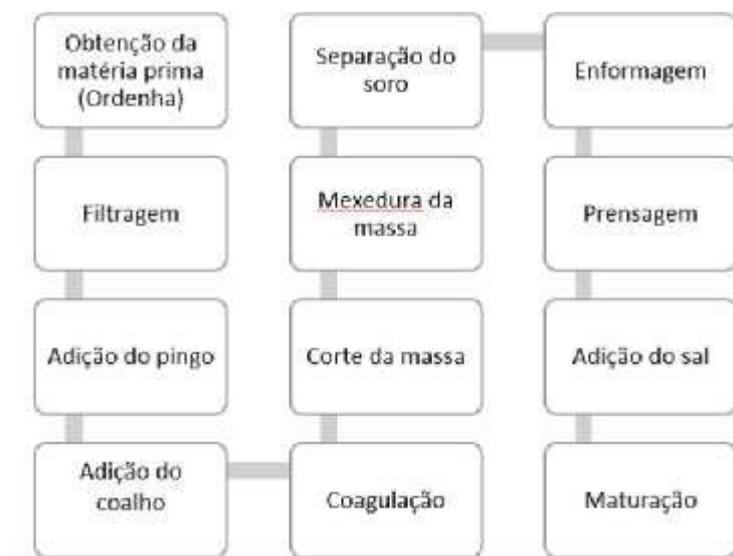


Figura 1 - Fluxograma de produção do queijo Canastra.

As características típicas encontradas no QMA da Canastra são: consistência semidura, textura compacta, cor branca-amarelada, formato cilíndrico, altura de 4 a 6 cm, diâmetro de 15 a 17 cm e peso de 1 a 1,2 kg. Nos municípios

de São Roque de Minas, Medeiros e Vargem Bonita há também a produção de um queijo diferenciado conhecido como queijo Canastra Real ou Canastrão, de formato cilíndrico, com altura entre 7 a 8 cm, diâmetro de 26 a 30 cm, peso entre 5 a 7 kg (ALMEIDA; FERNANDES, 2004).

Os queijos Artesanais se diferenciam pelo processo de fabricação de cada região produtora. Na região da Serra da Canastra pode-se encontrar o queijo Canastra tradicional também conhecido como queijo de casca lavada, onde no processo de maturação do queijo ocorre a lavagem da casca e até o toilet (raspagem da casca contaminada).

Existem também os queijos onde são adicionados ou desenvolvido fungos filamentosos intencionalmente em suas matrizes como no caso dos queijos Camembert, Brie, Gorgonzola e o Roquefort, que são encontrados fungos do tipo *Penicillium* (ZACARCHENCO et al., 2011).

Outro fator importante é a ocorrência do crescimento de fungos filamentosos indesejáveis no processo de produção e maturação dos queijos como nos casos de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Cladosporium* e *Verticillium* (ZACARCHENCO et al., 2011).

3.1.2 Produção em São Paulo

Em relação a produção de queijos artesanais em São Paulo pouco são os dados disponíveis até o momento, dificultando assim o dimensionamento do impacto social, econômico e alimentar que o papel do estado de São Paulo tem na produção artesanal de queijos no país.

Entretanto, a partir do manifesto originado pelos produtores artesanais do estado foi criado o chamado “Caminho do Queijo Paulista”, que consiste em uma rota composta por 17 queijarias localizadas em diferentes cidades do estado de São Paulo. Com o intuito de valorizar os queijos artesanais e a sua produção. O grupo conta com o apoio da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Governo do Estado (CHAISE, 2022).

3.2 Legislação de queijos artesanais

3.2.1 Legislação mineira

Segundo a Portaria nº 146 de 07 de março de 1996 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), considera-se Queijo Minas Artesanal o produto elaborado, a partir do leite cru, hígido, integral, de produção própria, com utilização de soro fermento (pingo). O produto deve apresentar consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, e que respeite o período mínimo de maturação estipulado por sua microrregião (MINAS GERAIS, 2020).

O tempo de maturação do Queijo Minas artesanal para comercialização interestadual foi estabelecido em 60 dias pela Portaria nº 1305/2013 do IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária), mas, em 2017, foi alterado pela Portaria IMA nº 1736/2017, passando a variar de acordo com a micro-região produtiva. Para a região da Serra da Canastra foi estabelecido um período mínimo de 22 dias (CORRÊA; QUINZANI; CAPOVILLA, 2014; MINAS GERAIS, 2017).

Outro fator importante para a preservação da cultura de produção de queijo artesanal foi a Instrução Normativa 25 de 2013 do INPI (Instituto Nacional de Proteção Industrial), que estabeleceu o registro de Indicação Geográfica para produtos característicos de determinadas regiões do país. A Indicação Geográfica, que consiste em relacionar um determinado produto a uma determinada região produtora e/ou designar um produto com o nome da região produtora é uma forma de identificação de procedência, qualidade, características específicas e tradição local (BRASIL, 1996; CORRÊA; QUINZANI; CAPOVILLA, 2014). O QMA da Serra

da Canastra é considerado especial, pois os fatores ambientais e de localização favorecem o desenvolvimento de um produto único (RESENDE, 2010).

A promulgação da Lei nº 13.680/2018 da Presidência da República, que implementou a identificação dos produtos artesanais em todo o território nacional com um selo único com a indicação “arte”, também foi importante para o cenário de QMA, pois permitiu a comercialização interestadual dos produtos artesanais no país ((BRASIL, 2018). Segundo Corrêa; Quinzani; Capovilla, (2014), a possibilidade de venda fora do estado de Minas Gerais influenciou o surgimento das lojas especializadas em queijos artesanais brasileiros em São Paulo.

Recentemente o decreto estadual de Minas Gerais 48.024 de 19 de agosto de 2020, reconhece o Queijo Minas Artesanal de Casca Florida. Segundo a resolução considera-se Queijo Minas Artesanal de Casca Florida (QMACF) o queijo elaborado a partir do leite cru, hígido, integral, de produção própria, com utilização de soro-fermento (pingo), cujo produto final apresente, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas e casca de aspecto rugoso, em que é visualmente constatada a presença e a dominância de fungos filamentosos de coloração branca e aspecto aveludado, sendo necessário que a casca do QMACF contenha a presença e dominância, visualmente constatada, de fungos filamentosos, tendo como espécie predominante o fungo *Galactomyces geotricum*, também conhecido por *Geotricum candidum* e *Geotrichum silvicola* (CAMPOS, 2020).

A resolução também permite a presença de outras espécies de fungos no QMACF desde que pesquisas científicas sejam realizadas por órgãos especializados no tema e certifiquem-se que tais espécies não comprometam a segurança alimentar (MINAS GERAIS, 2022).

3.2.2 Legislação paulista

De acordo com a Lei nº 17.453, de 18 de novembro de 2021 vigente no estado de São Paulo entende-se por produto de origem animal artesanal aquele cuja elaboração seja em pequena escala, utilize de técnicas predominantemente manuais, utilize de receita e processo desenvolvidos pelo próprio produtor ou que possuam características tradicionais, regionais ou culturais e limita a aquisição da matéria prima de terceiro em 50%, desde que a mesma tenha comprovação de inspeção higiênico-sanitária por órgão oficial. Esta legislação permite a utilização de leite cru para a fabricação de queijos artesanais, desde que atendidas às normas técnicas vigentes (SÃO PAULO, 2021)

No estado de São Paulo, para os produtos lácteos o Decreto N° 66.523, de 23 de fevereiro de 2022 determina como pequena escala uma produção de até

1.500 (um mil e quinhentos) litros de leite, como matéria-prima (SÃO PAULO, 2022). Não há esta limitação na legislação correspondente do estado de Minas Gerais.

Outra característica importante estipulada na Resolução SAA - 30, de 24 de setembro de 2001 é que o local de produção deve dispor de mesas de aço inoxidável ou outro material apropriado para os trabalhos de manipulação e preparo de matéria primas e produtos comestíveis montadas visando a fácil e perfeita higienização, sendo vedado o uso de madeira para produção (SÃO PAULO, 2001).

3.3 Queijos Maturados em Cavernas

Segundo a CBN (Central Brasileira de Notícias) a história dos queijos maturados em cavernas no Brasil começaram no século 20 com a maturação de queijos Canastra por um Frei em Minas Gerais. Com o objetivo de melhorar as características sensoriais dos queijos produzidos na região da Serra da Canastra, o Frei mantinha os queijos maturando em caverna na região do Caeté a 1.746 metros de altitude, promovendo assim a tradição de se maturar queijos em cavernas (VASCONCELOS, 2016).

O queijo maturado em caverna é tradicional na região da Itália, sendo produzido com leite cru e acondicionado em salas subterrâneas quentes, úmidas e em alguns casos com a presença de fungos, ocorrendo assim a colonização natural de fungos nos queijos. Porém a presença de espécies toxigênicas já foi relatada neste tipo de queijo (ANELLI et al., 2019).

Em relação aos principais fungos encontrados em queijos artesanais maturados em caverna, o estudo realizado por Alexa et al., (2022) foi analisado e identificado a microbiota das amostras de queijo Cabrales (queijo azul artesanal produzido na Espanha), e do ambiente de maturação das cavernas onde os queijos foram maturados, sendo identificado a presença dos fungos *Penicillium* e *Geotrichum*, no estudo descrito por Barbieri et al., (2012), destaca que no queijo fossa a presença mais predominante são os fungos *Penicillium* e *Aspergillus* na superfície dos queijos. Outro estudo onde foi destacado a variedade dos fungos filamentosos foi o descrito por Ozturkoglu Budak et al., (2016) onde foram avaliadas amostras de queijo turco Divle, maturados em caverna, nesse estudo foram isoladas mais de 100 cepas de fungos filamentosos, sendo o *Penicillium* o fungo mais predominante nas amostras analisadas.

3.4 Microbiota de queijos artesanais

A microbiota do QMA pode variar bastante em função da utilização de leite cru (sem tratamento térmico) no processo de produção. O leite cru contém uma chamada microbiota primária que, aliada à adição do coalho, responde pela transformação do leite em queijo, assim como a microbiota secundária, ambas originárias do fermento endógeno (pingo). Esta microbiota é composta por micro-organismos como bactérias, bolores e leveduras, que contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais do queijo durante o processo de maturação (BORELLI et al., 2006; OLIVEIRA, 2014; PINTO, 2004; RESENDE, 2010).

O queijo de modo geral é suscetível à contaminação por micro-organismos deteriorantes, patogênicos ou produtores de micotoxinas. Alguns trabalhos têm investigado a fundo a microbiota bacteriana de queijos artesanais brasileiros, incluindo o queijo Canastra (KAMIMURA et al., 2019; PERIN et al., 2017; RESENDE et al., 2011), relatando a contaminação por *Staphylococcus* (KAMIMURA et al., 2019), mas são poucos os trabalhos sobre a microbiota fúngica. Os fungos filamentosos são capazes de crescer em diferentes substratos, assim como nos queijos, podendo acarretar alterações na qualidade (aparência, sabor) e oferecer risco à saúde, quando estes fungos são produtores de micotoxinas (HYMERY et al., 2014). De acordo com Bessa et al., (2021) os fungos utilizam as fontes de carbono para seu desenvolvimento, sendo a reação enzimática através das lipases uma dessas reações. Essas reações enzimáticas que promovem a hidrólise e a síntese de triacilgliceróis, têm influência na modificação de gorduras e óleos originais nas matrizes alimentares, além de promover o realce do sabor no processamento e maturação de alimentos ((ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

Em alguns tipos de queijos certas espécies de fungos filamentosos são adicionadas intencionalmente, com a finalidade de aumentar a qualidade nutricional e sensorial do produto durante a maturação. Estes fungos são capazes de crescer no interior dos queijos, uma vez que toleram maiores concentrações de sal e CO₂ e podem se desenvolver em atividade de água (Aw) baixa (FOX et al., 2004; HYMERY et al., 2014). Duas espécies bem conhecidas são o *Penicillium*

camemberti e o *Penicillium roqueforti*, que desempenham um papel significativo na aparência, textura e sabor característico dos queijos. Estas espécies são conhecidas por sua capacidade de produzir micotoxinas; *P. camemberti* produz ácido ciclopiazônico (CPA) e *P. roqueforti* produz roquefortina C e ácido micofenólico (MPA). No entanto, esses metabólitos apresentam baixa toxicidade e estão presentes em baixas concentrações nos queijos. Devido ao longo histórico de consumo destes tipos de queijos (nenhum caso de intoxicação alimentar foi descrito na literatura), os Estados Unidos e a União Europeia consideram seguro o uso destes fungos, já reconhecidos como GRAS (generally recognized as safe) pela FDA (US Food and Drug Administration). Na União Europeia a EFSA (European Food Safety Authority) reconheceu a ausência de relatos de efeitos adversos à saúde devido ao consumo destes queijos, mas ainda não concedeu às duas espécies o status de QPS (presunção de segurança qualificada), devido à insuficiência de dados sobre a produção de micotoxinas, sua toxicidade e ocorrência nos queijos (COLLINS et al., 2011; HYMERY et al., 2014).

Outros tipos de fungos filamentosos foram detectados e estudados como no estudo realizado por Anelli et al., (2019) onde foram encontradas espécies do grupo section *Circumdati*, como *Aspergillus steynii* e *Aspergillus westerdijkiae* em amostras de queijos artesanais, esse grupo foi descrito no estudo realizado por Frisvad et al., (2004), como grupo que contém espécies produtoras de micotoxinas, como por exemplo as toxinas Ocratoxina A e Ocratoxina B.

3.5 Doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil (DTHA)

Estima-se que no mundo, anualmente, uma em cada 10 pessoas adoece devido ao consumo de alimentos contaminados (BRASIL, 2020). Dados emitidos pelo Ministério da Saúde em 2022 relataram 6.347 casos de surtos de doenças alimentares no país entre os anos de 2012 e 2021, contabilizando 89 casos fatais, O leite e seus derivados foram relacionados a 7,1 % dos casos, ocupando o 5º lugar entre os produtos implicados em doenças transmitidas por alimentos (DTHAs) no país. A região sudeste concentrou o maior número de casos, de acordo com o boletim epidemiológico emitido em 2022. O estado de Minas Gerais lidera o ranking dos estados com mais registros de ocorrências de DTHAs, com 14,33% dos casos,

seguido por São Paulo, com 13,44% e Rio Grande do Sul, com 12,17% (BRASIL, 2020, (BRASIL, 2022a).

Dentre os micro-organismos causadores de DTHAs, as bactérias são as mais frequentes, embora vírus e parasitas também tenham merecido uma atenção especial. No caso das micotoxinas os registros são raros ou inexistentes no Brasil, em função da dificuldade em associar o consumo de um alimento às micotoxicoses em humanos. Nos animais estes registros são mais comuns. Entretanto, no mesmo boletim epidemiológico emitido Ministério da Saúde citado anteriormente, destaca-se que no ano de 2019 quase 50 % dos diagnósticos de DTHA foram classificados como inconclusivos, tendo um valor de mais de 35% no ano de 2021. Os fungos não têm uma classificação específica nesse levantamento, sendo contemplados na categoria “Outros”, para definir os principais microrganismos causadores de DTHAs no Brasil. A categoria “Outros” ocupa o segundo lugar no ranking de microrganismos causadores de surtos no país, destacando a importância de se identificar os possíveis microrganismos causadores de surtos alimentares no Brasil que se encontram classificados neste grupo “outros”, além do potencial toxigênico e de risco a saúde atrelados aos fungos (BRASIL, 2022a).

A contaminação por fungos indesejáveis pode ocorrer em qualquer fase da cadeia produtiva dos queijos artesanais, incluindo-se até a presença nas matérias-primas. Espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Verticillium* e *Torrubiella* têm sido frequentemente encontrados como contaminantes em amostras de leite e queijos (BARRIOS et al., 1998; DELAVENNE et al., 2011; ZACARCHENCO et al., 2011).

3.6 Micotoxinas encontradas nos queijos

As principais micotoxinas encontradas nos queijos são a aflatoxina M1 (AFM1) e a ocratoxina A (OTA). Estas toxinas são produzidas principalmente por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, podendo ocorrer via contaminação direta e/ou indireta do queijo.

As aflatoxinas (AFs) encontram-se entre as micotoxinas mais frequentemente encontradas em alimentos e rações. São produzidas principalmente pelas espécies de *Aspergillus section Flavi*. Podem ocorrer no queijo

por contaminação direta do produto pelos fungos ou originada do leite produzido por animais leiteiros alimentados com ração contaminada por Aflatoxina B1. A Aflatoxina B1 é metabolizada no animal, transformando-se em Aflatoxina M1, que é excretada no leite.

A aflatoxina B1 é conhecida por causar dano hepático e ser carcinogênica, classificada pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) como pertencente ao grupo 1 (carcinogênica para humanos, IARC, 1993). A aflatoxina M1 é monitorada no leite e seus derivados em diversos países, devido ao seu potencial de toxidez (CATHEY et al., 1994; EFSA, 2004; HYMERY et al., 2014; MADIGAN, 2016).

No Brasil a Resolução RDC Nº 722 de 1 de julho de 2022 e a IN (Instrução Normativa) 160 Anexo II de 6 de julho de 2022 da ANVISA (agência Nacional de Vigilância Sanitária), estabeleceram um limite máximo de 2,5 µg/kg de aflatoxina M1 nos queijos. Na União Europeia este valor máximo para queijos é de 0,05 µg/kg. Nos Estados Unidos é de 0,05 µg/kg no leite destinado à fabricação de queijos e na China é de 0,5 µg/kg também no leite (BRASIL, 2022b; HYMERY et al., 2014).

Devido a quantidade significativa de NaCl introduzida no processo de salga dos queijos, pode ocorrer o desenvolvimento de micro-organismos que conseguem adaptar-se a maiores concentrações salinas, como *Penicillium nordicum* e *Penicillium verrucosum*, por exemplo, produtores de OTA (HYMERY et al., 2014; (SCHMIDT-HEYDT et al., 2012). Além disto, estas espécies são psicrotróficas, crescendo em climas temperados e ambientes refrigerados (PITT; HOCKING, 2009).

Outra micotoxina que tem sido encontrada em queijos de diferentes origens é a ocratoxina A (OTA), que pode ser produzida, principalmente por *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum* (ANELLI et al., 2019; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; PATTONO et al., 2013; PITT; HOCKING, 2009).

Na Tabela 1 são apresentadas as micotoxinas estudadas em queijos de várias partes do mundo. A mais estudada e mais frequentemente encontrada é a aflatoxina M1. Pradoet al., (2000) avaliaram amostras de diferentes queijos

produzidas no estado de Minas Gerais e encontraram uma média de contaminação por aflatoxina M1 de 0,36 µg/kg nas amostras da Serra da Canastra. Oliveira et al., (2011) detectaram concentrações de aflatoxina M1 variando entre 0,142 e 0,118 µg/kg em amostras de queijo Minas frescal e Minas padrão produzidos no estado de São Paulo.

Tabela 1 - Ocorrência de micotoxinas em queijos de várias partes do mundo

Tipo de queijo	Local	Micotoxinas	Amostras Totais/ positivas	Nível de toxinas (µg/Kg)	Metodologia	Referência
Queijo azul	Itália	Ocratoxina A	92/30	0,1 – 3,0	HPLC	(DALL'ASTA et al., 2008)
Queijo de caverna	Itália	Ocratoxina A	22/8	0,2 - 317	HPLC	(ANELLI et al., 2019)
Semi duro	Itália	Ocratoxina A	32/6	1 - 262	HPLC	(PATTONO et al., 2013)
Queijo azul	Finlândia	Ácido micofenólico	11/1	300	LC-MS	(KOKKONEN; JESTOI; RIZZO, 2005)
Minas frescal e padrão	Brasil	Aflatoxina M1	48/13	0,037 - 0,313	HPLC	(OLIVEIRA et al., 2011)
Queijo branco	Paquistão	Aflatoxina M1	119/93	0,004 – 0,595	HPLC	(IQBAL; ASI, 2013)
Queijo cremoso	Paquistão	Aflatoxina M1	150/89	0,004 – 0,456	HPLC	(IQBAL; ASI, 2013)

3.6.1 Ocratoxina A (OTA)

A Ocratoxina A (OTA), é um metabólito secundário produzido principalmente por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* e apresenta em sua estrutura uma ligação β- fenilalanina a uma molécula de diidroisocumarina. A OTA uma das micotoxinas classificadas como substância de risco a saúde animal e humana, possivelmente cancerígena do grupo 2A pela International Agency for Research on Cancer (IARC), e a estrutura química da Ocratoxina A está representada na **Figura 2** (ANDRADE; LANÇAS, 2015).

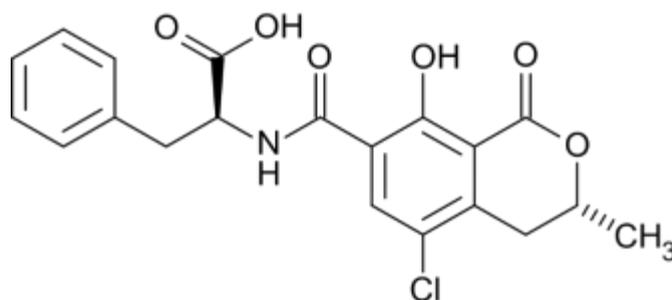


Figura 2 - Estrutura química da Ocratoxina A (OTA).

A OTA pode estar associada a danos renais, assim como à necrose hepática e enterites. Devido a esses fatores o estudo da ocorrência de OTA em alimentos é de extrema importância para a saúde pública (CHU; WILSON, 2008; KUIPER-GOODMAN; SCOTT, 1989; MAGNOLI et al., 2006; SIMON, 2008).

Recentemente, ANELLI *et al.* (2019) encontraram as espécies de *Aspergillus westerdijkiae* e *Aspergillus steynii* produtoras de OTA em 45% das amostras de queijos de cavernas (*Cave cheese*) na Itália. Neste estudo a OTA foi detectada em 36% das amostras analisadas. Pattono et al., (2013) também detectaram a presença de OTA em queijos semiduros na Itália. Tal fato sugere que a OTA também pode estar presente em queijos fabricados no Brasil, uma vez que estas espécies de *Aspergillus* são bem adaptadas a climas mais quentes e já foram isoladas de alimentos produzidos no Brasil (café, cereais e cacau, dentre outros). Num trabalho realizado em 1992 por nossa equipe, a OTA não foi encontrada nos queijos analisados, porém, na época foi utilizada uma metodologia (cromatografia de camada delgada) sem grande sensibilidade e especificidade para a detecção desta toxina no queijo (TANIWAKI; VAN DENDER, 1992).

Outras micotoxinas como ácido micofenólico, patulina, citrinina, toxina PR e esterigmatocistina têm sido avaliadas em queijos, mas raramente encontradas. Hymery et al., (2014) após uma extensiva revisão das possíveis micotoxinas e fungos toxigênicos encontrados nos queijos de várias partes do mundo, concluíram que as micotoxinas de maior risco são a aflatoxina M₁ e a ocratoxina A, devido à maior estabilidade e toxidez.

3.7 Fatores que afetam a produção de micotoxinas em queijos

Alguns fatores externos e internos podem interferir diretamente na produção de micotoxinas nos queijos. Dentre as condições externas estão a temperatura, a disponibilidade de oxigênio e a umidade relativa do ambiente. Dentre as condições internas estão a atividade de água e o pH, além de interações entre micro-organismos presentes na microbiota do queijo (MAGAN; ALDRED, 2007).

Outro fator que influencia o desenvolvimento de micro-organismos no queijo é o tempo de maturação que, em muitos casos, pode reduzir a microbiota indesejável do produto. Borelli et al., (2006), relatam em seu estudo uma redução dos micro-organismos indicadores higiênico-sanitários ao longo do tempo de maturação de amostras de QMA coletadas e produzidas na região da Serra da Canastra, em alguns casos chegando a níveis abaixo do limite de detecção dos métodos. Para avaliar tal efeito sobre a produção de micotoxinas, entretanto, são necessários mais estudos, uma vez que dados sobre a ocorrência de fungos e toxinas nos queijos da Serra da Canastra são escassos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram visitadas 6 queijarias na região da Serra da Canastra e uma fazenda em Amparo, São Paulo. Além disso, foram adquiridas amostras do comércio de São Paulo, totalizando 70 amostras de, aproximadamente, 1 kg de queijo, sendo 34 amostras de queijos artesanais na região da Serra da Canastra/MG, 7 amostras de queijos artesanais produzidos na cidade de Amparo/SP e 29 amostras comerciais das cidades produtoras, do estado de Minas Gerais e São Paulo. As amostras de queijo foram mantidas em sacos estéreis e sob refrigeração até os inícios das análises. Além disso, foram feitas raspagens das bancadas em que os queijos foram colocados durante a maturação e estocagem. Estas raspagens foram inoculadas durante a amostragem no meio ágar dicloran glicerol 18% (DG18). O ar foi aspirado por 5 minutos com o amostrador de ar da marca Andersen (Bionergetica, Rio de Janeiro, RJ) acoplada a uma placa do meio de cultura Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC).

4.2 Análise micológica

Em uma bolsa plástica estéril, 25 g das amostras de queijo foram homogeneizadas com 225 mL de solução de água peptonada a 0,1% em stomacher por 2 min. Em seguida foram feitas diluições em série da solução inicial e inoculadas em meio ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) para as amostras com atividade de água superior à 0,95 e ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18) para amostras com A_w abaixo de 0,95, de acordo com Pitt; Hocking, (2009). As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias. Após o crescimento foi feita a contagem das colônias, a seleção e isolamento dos fungos e a transferência para tubos contendo ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA), para preservação das culturas até a identificação. O processo está apresentado na **Figura 3**.

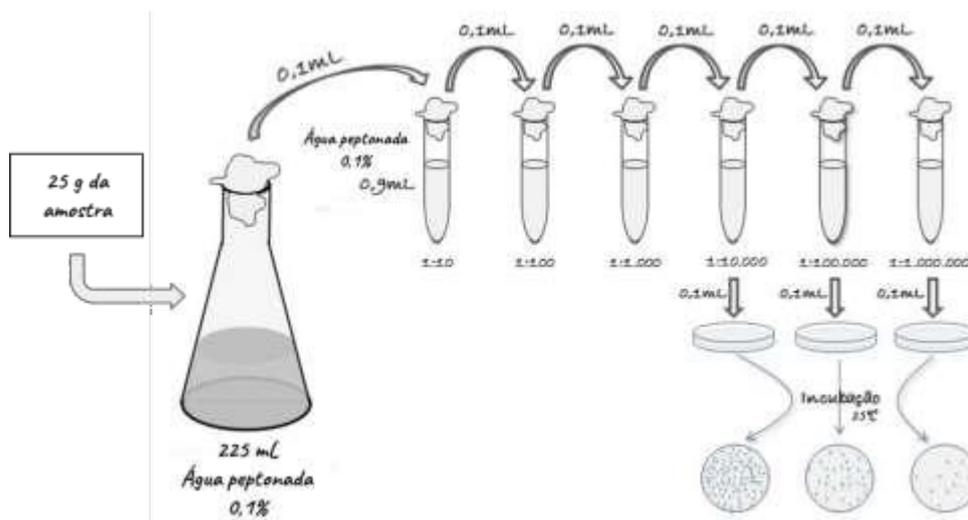


Figura 3 - Esquema da análise de Diluição Seriada.
Fonte: Bacilos na sopa

A atividade de água (A_w) foi determinada no aparelho Aqualab, modelo 3TE (Decagon, USA). As leituras foram realizadas em triplicatas a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

4.3 Identificação morfológica dos fungos e análise da capacidade toxigênica.

Representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e demais fungos presentes foram contados e isolados em meio CYA. Os isolados foram identificados e agrupados morfológicamente conforme seus morfo-tipos segundo o procedimento descrito por Klich, (2002) para *Aspergillus* spp. e Pitt (1988) para *Penicillium* spp. Os demais fungos foram identificados de acordo com Pitt; Hocking, (2009) e Samson et al., (2010).

Os fungos com potencial para produção de toxinas foram inoculados em ágar Extrato de Levedura e Sacarose (YESA) e quantificados por HPLC, segundo Accensi; Abarca; Cabañes, (2004), para a produção de ocratoxina A (OTA).

4.4 Identificação molecular das cepas de *Aspergillus* produtores de OTA.

Para a identificação de isolados do grupo *Aspergillus* section *Circumdati* foram utilizados dados de sequências de nucleotídeos de porções do gene de calmodulina. A amplificação de uma porção do gene da calmodulina foram feitas

utilizando os primers CF1 e CF4 (5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG 3') descritos por Hong et al., (2006). Para a reação foi utilizado o Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standard Kit Version 3.1 (Applied Biosystems). Ao final, um volume de HiDiformamida (10 µL) foi adicionado aos produtos de sequenciamento, os quais foram processados em Analisador Genético ABI 3500XL (AppliedBiosystems). Para a identificação do isolado, as sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com aquelas já depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology and Information (NCBI), fazendo uso da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Quando necessário, árvores filogenéticas foram reconstruídas fazendo-se uso do pacote computacional MEGA5.

4.5 Otimização da metodologia para análise de OTA por HPLC.

Buscando a melhor eficiência do processo de detecção e quantificação da OTA pelo método de HPLC, foram pesquisados alguns métodos de extração e quantificação de Ocratoxina A (OTA) em matrizes alimentares. Foram testadas 3 metodologias variando tempo de agitação no shaker (minutos), tipo de filtração, colunas de diferentes marcas, solvente de extração e solução de diluição do filtrado. Para essas análises, o queijo foi contaminado com uma concentração conhecida de OTA e foi verificado a recuperação para cada teste, até encontrar a melhor metodologia de extração.

4.6 Extração e quantificação de ocratoxina A dos queijos.

A extração de ocratoxina A (OTA) das amostras dos queijos foi adaptada de acordo com a metodologia de Pietri et al., (2022). Em uma alíquota de 10 g de queijo foram adicionados 50 mL de acetonitrila e 50 mL de solução aquosa de bicarbonato 0,13M. A amostra foi homogeneizada por 30 min e centrifugada (6000 rpm, 10 min, 4°C). A amostra foi filtrada através de papel de filtro com uma bomba a vácuo e uma alíquota dessa amostra (5 mL) foi passada por uma coluna de imunoafinidade OTA (Vicam, Waters). A eluição da toxina foi feita utilizando solução de metanol:ácido acético (98:02) como solvente. A toxina eluída passou pelo

processo de secagem com nitrogênio e foi re-suspendida em fase móvel com acetonitrila: água: ácido acético (57:41:2).

Para a detecção e quantificação de ocratoxina A no queijo foi usado o sistema de CLAE modelo Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EUA) com detecção por fluorescência, de acordo com Anelli et al., (2019) utilizando uma coluna cromatográfica C18 Shimadzu (4,6 x 250 mm) com diâmetro de partícula 5 μ . As condições do método de análise foram: método isocrático utilizando a fase móvel acetonitrila: água: ácido acético (57:41:2), temperatura da coluna 40°C, fluxo de 0,8 mL/min. O padrão de ocratoxina A (Sigma-Aldrich) foi utilizado para a construção da curva padrão e para a quantificação das amostras, além disso foram feitos vários testes de recuperação com três níveis diferentes de OTA: nível baixo: 2,30 μ g/kg com recuperação de 96%; nível médio: 4,55 μ g/kg com recuperação de 98%; nível alto: 6,85 μ g/kg com recuperação de 92%. Além disso, foram determinados os limites de detecção (LOD: 0,2861) e o limite de quantificação (LOQ: 0,9527).

4.7 Análise de gordura

A metodologia utilizada para a determinação dos teores de gordura foi através do butirômetro de Gerber, descrita pelo Instituto Adolfo Lutz, (2008).

4.8 Análise estatística

Para a análise dos dados brutos obtidos foi utilizado a ferramenta Microsoft Excel, para tirar os valores de média, desvio padrão e variância, assim como para a realização da análise de variância (ANOVA) e correlação dos dados de acordo com o Diagrama de Venn.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da atividade de água (A_w) e análise micológica.

Os resultados da atividade de água e a contagem de bolores e leveduras das amostras, podem ser encontradas na **Tabela 2**. A maioria dos queijos apresentou bolores em sua superfície, como mostra a **Figura 4**, resultante das câmaras de maturação.



Figura 4 - Queijos artesanais coletados na Serra da Canastra, MG e em Amparo, SP.

Tabela 2 - Atividade de água (aw) e contagem total de bolores e leveduras presentes nas amostras de queijos artesanais da Serra da Canastra e São Paulo.

Código do queijo	Tempo de maturação (dias)	aw	Contagem total de leveduras (UFC/g)	Contagem total de bolores (UFC/g)
1	-	0,826	2,4 X10 ⁴	0
2	-	0,955	5,2 X10 ⁶	2,8 X10 ⁴
3	-	0,942	3,8 X10 ⁷	0
4	-	0,939	2,3 X10 ⁸	0
5	-	0,939	3,9 X10 ⁵	0
6	-	0,948	5,4 X10 ⁵	0
7	-	0,974	1,0 X10 ⁵	1,0 X10 ²
8	-	0,969	1,7 X10 ⁸	1,5 X10 ⁵
9	-	0,974	2,0 X10 ⁶	1,3 X10 ³
10	-	0,956	3,6 X10 ⁶	0
11	0	0,971	1,3 X10 ⁵	7,0 X10 ³
12	12	0,956	1,5 X10 ⁵	2,0 X10 ⁵
13	14	0,958	1,2 X10 ⁹	1,7 X10 ⁵
14	30	0,969	5,7 X10 ⁷	1,6 X10 ⁶
15	8-9	0,962	5,7 X 10 ⁷	1,6 X 10 ⁶
16	16	0,967	1,8 X 10 ⁷	2,2 X 10 ⁷
17	+16	0,939	2,0 X 10 ⁶	5,0 X 10 ⁴
18	+16	0,942	3,7 X 10 ⁶	9,0 X 10 ⁵
19	+16	0,928	1,3 X 10 ⁶	1,2 X 10 ⁵

20	+30	0,883	4,0 X 10 ⁵	1,0 X 10 ⁷
21	+30	0,856	Incontável	1,7 X 10 ⁶
22	0	0,954	2,2 X10 ⁷	2,0 X10 ⁴
23	12	0,944	1,9 X10 ⁷	0
24	14	0,945	9,9 X10 ⁶	0
25	30	0,864	8,3 X10 ⁶	1,3 X10 ⁵
26	30	0,855	5,6 X10 ⁶	1,4 X10 ⁵
27	60	0,863	5,4 X10 ⁷	1,7 X10 ⁵
28	60	0,835	6,9 X10 ⁷	7,0 X10 ⁵
29	90	0,858	1,4 X10 ⁶	1,5 X10 ⁵
30	90	0,834	5,2 X10 ⁶	2,0 X10 ⁵
31	90	0,817	2,0 X10 ⁷	1,7 X10 ⁵
32	0	0,962	3,0 X 10 ⁶	6,0 X 10 ⁵
33	8	0,958	7,2 X 10 ⁷	1,0 X 10 ⁷
34	13	0,957	3,7 X 10 ⁷	2,4 X 10 ⁷
35	2	0,950	5,7 X 10 ⁷	1,6 X 10 ⁶
36	7	0,944	1,8 X 10 ⁷	2,2 X 10 ⁷
37	14	0,969	2,0 X 10 ⁶	5,0 X 10 ⁴
38	45	0,892	3,7 X 10 ⁶	9,0 X 10 ⁵
39	90	0,854	1,3 X 10 ⁶	1,2 X 10 ⁵
40	90	0,841	4,0 X 10 ⁵	1,0 X 10 ⁷
41	2	0,954	6,4 X 10 ⁶	1,0 X 10 ⁵
42	12	0,960	3,4 X 10 ⁷	1,0 X 10 ⁷
43	+70	0,969	6,0 X 10 ⁷	1,0 X 10 ⁷
44	+100	0,941	6,0 X 10 ⁷	1,2 X 10 ⁸
45	2	0,963	1,3 X 10 ⁷	0
46	8	0,955	5,2 X 10 ⁷	4,0 X 10 ⁴
47	+10	0,960	1,0 X 10 ⁷	5,0 X 10 ⁷
48	90	0,920	5,2 X 10 ⁵	4,0 X 10 ⁴
49	60	0,969	7,1 X10 ⁶	4,2 X10 ⁶
50	+60	0,891	2,1 X10 ⁷	2,7 X10 ⁵
51	+60	0,924	2,1 X10 ⁷	2,7 X10 ⁵
52	18	0,976	1,0 X10 ⁸	3,7 X 10 ⁷
53	19	0,986	9,1 X 10 ⁶	1,0 X 10 ⁶
54	3	0,980	7,0 X 10 ⁷	7,0 X 10 ³
55	165	0,941	1,0 X 10 ⁷	3,0 X 10 ⁶
56	150	0,882	2,1 X 10 ⁶	6,0 X 10 ⁶
57	60	0,869	4,8 X 10 ⁶	3,6 X 10 ⁴
58	365	0,868	2,8 X 10 ⁷	2,6 X 10 ⁴
59	60	0,954	7,6 X10 ⁷	4,6 X10 ⁵

60	+60	0,964	1,0 X10 ⁷	5,6 X10 ⁴
61	+60	0,967	6,1 X10 ⁶	4,6 X10 ⁶
62	-	0,915	2,8 X 10 ⁵	8,7 X 10 ⁴
63	-	0,950	1,1 X10 ⁶	1,0 X10 ⁶
64	-	0,975	9,0 X10 ⁶	2,4 X10 ⁶
65	-	0,975	3,0 X10 ⁶	1,4 X10 ⁶
66	-	0,969	3,5 X10 ⁶	1,4 X10 ⁶
67	-	0,958	1,0 X 10 ⁵	1,0 X10 ⁶
68	-	0,964	3,0 X10 ⁶	3,0 X10 ⁵
69	-	0,966	3,0 X10 ⁶	2,0 X10 ⁶
70	-	0,967	2,1 X10 ⁶	5,0 X10 ⁶

De acordo com Magan, (2006), a atividade de água está totalmente relacionada com a produção de micotoxinas em matrizes alimentares. Magan (2006) menciona que fungos produtores de OTA podem crescer e produzir a micotoxina com valores mínimos próximos de 0,80 de Aw, destacando que os valores ótimos para a produção de OTA estão geralmente relacionados a valores acima de 0,90 de Aw. Com isso, podemos observar que 24 % das amostras estavam com valores entre 0,8 e 0,9 de Aw (tabela 2), não sendo estes os valores ideais, porém ainda propícios para a produção de toxinas e 76% das amostras com níveis ótimos de Aw para a produção de toxinas.

5.2 Identificação morfológica

A identificação morfológica foi feita selecionando os bolores encontrados em cada amostra de queijo e nas amostras de ar e raspagem das bancadas coletadas. Foram isolados um total de 516 bolores a maioria pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (22%), *Penicillium* (19%) e *Geotricum* (19%), seguido por *Cladosporium* (13%), conforme mostra a Figura 5. Outros gêneros e grupos minoritários somados representam (27%) do total e foram identificados como: Ascomicetos, *Trichoderma*, *Phoma*, fungos dematiaceos, e *Fusarium*.

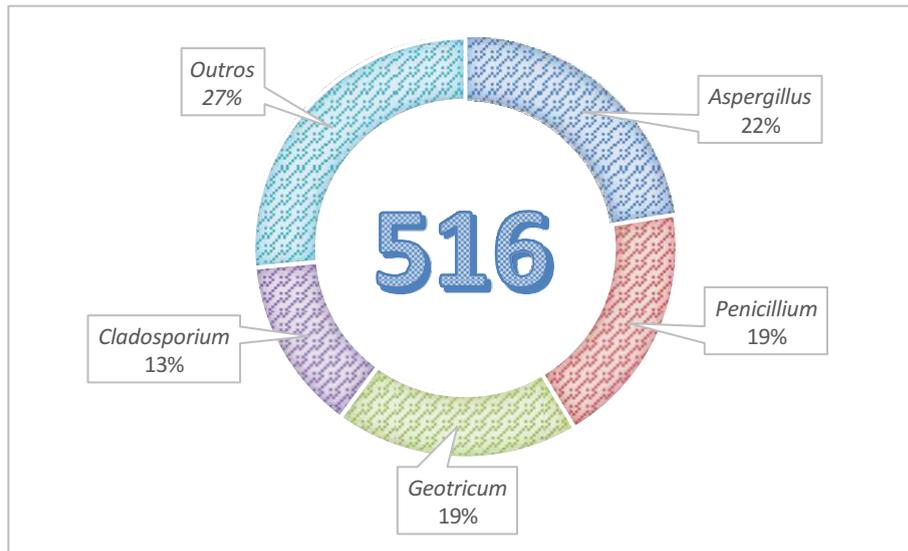


Figura 5 - Total de fungos e a representação dos maiores grupos isolados.

Dentro do gênero *Aspergillus* isolados, 28,2% foram identificados morfologicamente como pertencentes a *Aspergillus* section *Circumdatti*, grupo este, que inclui espécies produtoras de ocratoxina A, como *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* conforme os dados apresentados na **Figura 6**.

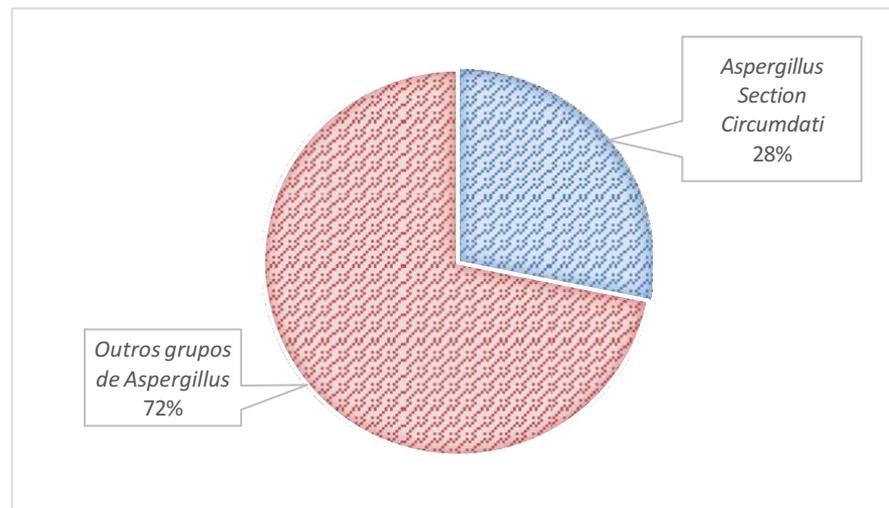


Figura 6 - Percentual de *A. Section Circumdatti* dentro do total de *Aspergillus* isolados.

Em seguida foi realizada uma correlação entre os tipos de fungos isolados e a origem da coleta das amostras, e essa correlação está apresentada no diagrama de venn disponibilizado na **Figura 7**.

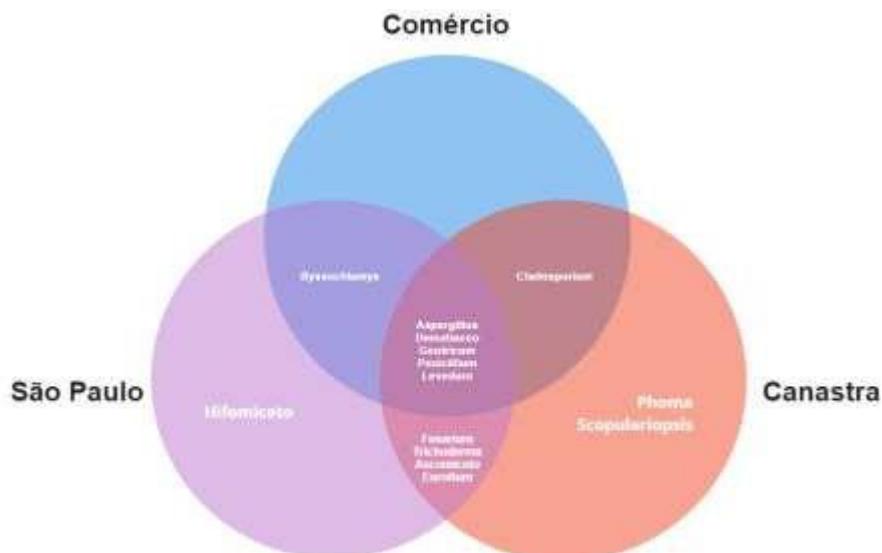


Figura 7 - Correlação fungos isolados e locais de coleta das amostras

Com essa correlação foi possível observar que os principais grupos em que pertencem os fungos filamentosos produtores de OTA, tais como, *Aspergillus* e *Penicillium* foram comumente encontrados nas amostras de todos os locais coletados.

5.2.1 Morfologias de *Aspergillus* e *Penicillium* em 3 diferentes meios de cultura.

A morfologia das cepas de *Aspergillus* e *Penicillium*, nos 3 meios de cultura, CYA (Ágar Czapek Extrato de Levedura), YESA (Ágar Sacarose Extrato de Levedura) e MEA (Ágar Extrato de Malte) podem ser visualizadas na **Figura 8** (morfologia das colônias) e **Figura 9** (microscopia).



Figura 8 - Cepas de *Penicillium* (acima). Cepas de *Aspergillus* (abaixo). Ordem dos meios esq. para dir. YESA, MEA e CYA.

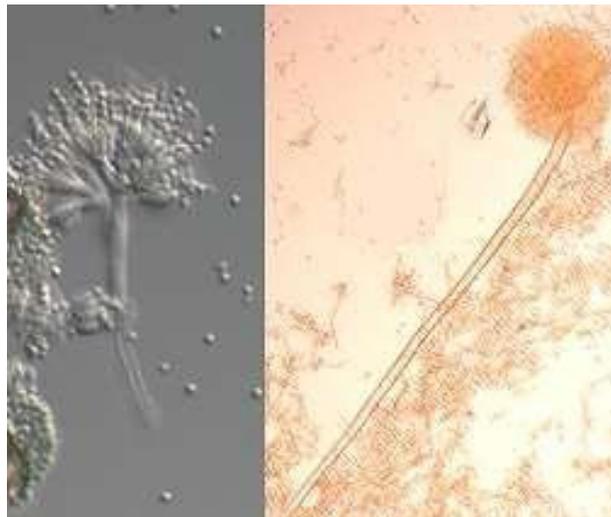


Figura 9 - Análise de microscopia onde a cepa de *Penicillium* (esquerda) e a cepa de *Aspergillus* (direita).

5.3 Otimização da metodologia para análise de OTA por HPLC.

Os resultados das otimizações das análises de ocratoxina A com as seguintes variáveis: tempo, temperatura, agitação, solvente, coluna de

imunoafinidade, além dos parâmetros de quantificação, vazão da fase móvel durante a corrida e quantidade de amostra injetada são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Parâmetros de otimização comparando as metodologias descritas nos artigos.

	Parâmetros	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Extração	Metodologia	(SILVA et al., 2021)	(ANELLI et al., 2019) modificado	(PIETRI et al., 2022)
	Massa da amostra	5g	5g	5g
	solvente de Extração	MeOH + NaHCO ₃ (1%)	MeOH + NaHCO ₃ (1%)	ACN + NaHCO ₃ (0.13 M)
	Proporção sol. extração	1:1	1:1	1:1
Separação	Tempo de agitação Shaker (min)	30	120	45
	Tipo de filtração	Dupla filtração	Dupla filtração	Dupla filtração
	Solvente de filtração	*PBS + tween 20	Sol. bicarbonato + NaCl	*PBS
	Imunoafinidade	Ochratest Vicam	Ochratest Vicam	Ochratest Vicam
Quantificação	Fase móvel (FM)	MeOH: H2O: ACN: ác. Acético	MeOH: H2O: Ác Acético	MeOH: H2O: Ác Acético
	Proporção FM	35: 35: 39: 01	51: 47: 02	51: 47: 02
	Concentração do sol. padrão OTA	4,55 µg/kg	4,55 µg/kg	4,55 µg/kg
	Recuperação	23,12%	2,34 %	45,87 %

*Tampão fosfato salino

Nos 3 primeiros testes realizados para a etapa de extração da OTA foram adotadas metodologias semelhantes onde os principais pontos de mudança foram os solventes de extração e o solvente utilizado para o processo de filtração, onde o teste 3 foi o mais eficiente dentre as tentativas obtendo 45,87% de recuperação, valor esse longe dos 80% mínimo aceitável considerando outros artigos publicados sobre OTA em outras matrizes alimentares.

Os valores obtidos no processo de verificação das metodologias demonstraram que uma das metodologias estava muito abaixo do esperado, sendo descartada imediatamente.

Nesses testes iniciais de extração foi observado que o processo de filtração via filtro convencional utilizado e descrito em muitos artigos demandava um tempo significativo, era preciso horas de extração para se obter o material filtrado, sendo um tempo consideravelmente grande para uma filtração, isso deixava o processo de extração muito demorado, portanto foi proposto uma etapa de centrifugação das

amostras e a utilização de filtração via bomba de vácuo e kitassato para a redução do tempo de filtração.

Na segunda tentativa de otimização e melhora na recuperação da amostra contaminada foi proposto as metodologias modificadas dispostas na **Tabela 4** a seguir.

Tabela 4 – Segundo teste para otimização do método de extração e recuperação de OTA.

	Parâmetros	Teste 4	Teste 5	Teste 6
Extração	Metodologia	SILVA et al., (2021)	PIETRI et al. (2022) Modificado	PIETRI et al. (2022) Modificado
	Massa da amostra	5g	5g	5g
	Solvente de Extração	MeOH + NaHCO ₃ (0.13 M)	MeOH + NaHCO ₃ (0.13 M)	ACN + NaHCO ₃ (0.13 M)
	Proporção sol.extração	1:1	1:1	1:1
	Tempo de agitação Shaker (min)	30	45	45
	Centrifugação(RPM)	6.000	6.000	6.000
Separação	Tipo de filtração	Bomba a vácuo	Bomba a vácuo	Bomba a vácuo
	Solvente de filtração	PBS* + tween 20 e H ₂ O	PBS*	PBS*
	Imunoafinidade	Ochratest Vicam	Ochratest Vicam	Ochratest Vicam
Quantificação	Fase móvel (FM)	MeOH: H ₂ O: ACN: ác. Acético	ACN: H ₂ O: Ác Acético	ACN: H ₂ O: Ác Acético
	Proporção FM	30:30:39:01	51:47:02	51: 47: 02
	Concentração dosol. padrão OTA	4,55 µg/kg	4,55 µg/kg	4,55 µg/kg
	Recuperação	23,70 %	45,87 %	55,45%

Após modificações e adição das etapas de centrifugação e filtração a vácuo reduzir significativamente para questão de minutos o processo de extração e filtração, foi possível observar um aumento na recuperação do teste 6, entretanto apesar da otimização da otimização proporcionar níveis acima de 50% para a metodologia modificada descrita no teste 6, afim de melhorar a recuperação e a confiabilidade do experimento, foi proposto que se fizesse a melhor metodologia de

extração testando colunas de diferentes fornecedores e de diferentes tipos, conforme apresentado na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Terceiro teste para otimização do método de extração e recuperação de OTA.

Parâmetros		Teste 7	Teste 8	Teste 9
Extração	Metodologia	PIETRI <i>et al.</i> (2022) Modificado	PIETRI <i>et al.</i> (2022) Modificado	PIETRI <i>et al.</i> (2022) Modificado
	Massa da amostra	5g	5g	5g
	Solvente de Extração	ACN + NaHCO ₃ (0.13 M)	ACN + NaHCO ₃ (0.13 M)	ACN + NaHCO ₃ (0.13 M)
	Proporção sol. Extração	1:1	1:1	1:1
	Tempo de agitação Shaker (min)	45	45	45
	Centrifugação (RPM)	6.000	6.000	6.000
Separação	Tipo de filtração	Vácuo	Vácuo	Vácuo
	Solvente de filtração	PBS	PBS	PBS
	Imunoafinidade	Ochratest Vicam	Ochratest Vicam WB	Ochraprep R-biopharm
Quantificação	Fase móvel (FM)	ACN: H ₂ O: Ác Acético	ACN: H ₂ O: Ác Acético	ACN: H ₂ O: Ác Acético
	Proporção FM	51: 47: 02	51: 47: 02	51: 47: 02
	Concentração do sol. padrão OTA	4,55 µg/kg	4,55 µg/kg	4,55 µg/kg
	Recuperação	88,87%	96,29%	79,76%

Nos testes descritos na tabela 5 acima, as únicas variáveis que foram modificadas foram as colunas de imunoafinidade, sendo adotado a melhor metodologia de extração dos testes anteriores como padrão.

Os testes apresentaram uma recuperação variando de 79% a 96%, sendo o teste 8 que obteve a melhor recuperação dentre os testes realizados. Desta forma para a extração de OTA nas amostras de queijo foi adotado os parâmetros descritos por PIETRI *et al.* (2022) com as modificações apresentadas no teste 8

5.4 Análise de ocratoxina A (OTA) nas amostras de queijo.

O seguinte critério foi adotado: nas amostras que apresentaram contagem baixa de bolores e leveduras e sem crescimento visível de *A. section Cicumdati*, as extrações foram realizadas em uma parte única homogênea do queijo. Porém, as amostras com uma taxa elevada de contagem desse grupo, foram divididas em parte interna e casca, com a finalidade de entender se esta alta contagem estava relacionada com a quantidade de OTA.

A ocorrência de ocratoxina A foi encontrada em 15 amostras de queijos, representando 21% das amostras analisadas conforme apresenta a Tabela 6 e Figura 10. Geralmente, as amostras contaminadas apresentaram uma quantidade de OTA tanto na parte interna, quanto na parte externa do queijo. Pouco se sabe sobre a relação entre o tempo de maturação e a ocorrência de OTA nas amostras de queijo, porém, é um ponto que deve ser considerado, uma vez que a maioria das amostras contaminadas estavam com mais de 30 dias de maturação.

Tabela 6 - Ocorrência de ocratoxina A (OTA) nas amostras de queijos artesanais da Serra da Canastra e São Paulo.

Código do queijo	Tempo de maturação (dias)	OTA Parte interna (µg/kg)	OTA Casca (µg/kg)
20	+30	-	5,7
21	+30	4,7	2874,9
25	30	-	88,5
26	30	1,2	12,8
27	60	-	126
28	60	5658,4	2462
29	90	-	6,7
30	90	1,0	22,9
31	90	-	1090,7
39	90	2,7	22,9
40	90	4,5	2,1
49	60	-	5,3
53	19	9,4	
64	-	-	4,8
65	-	9,9	-

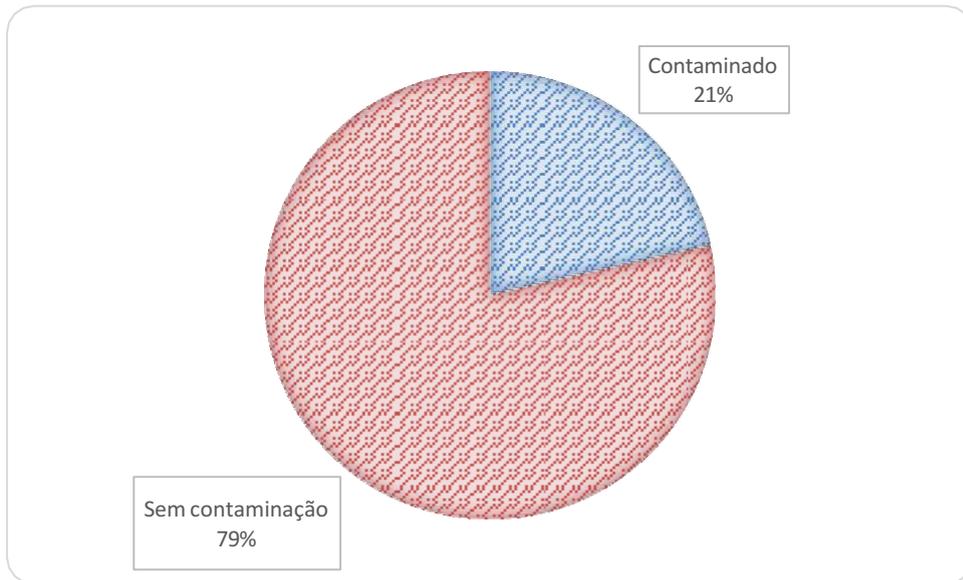


Figura 10 - Relação amostras contaminadas e não contaminadas em relação ao total de 70 amostras coletadas.

Entretanto é importante destacar que dentre as 15 amostras que estavam contaminada com OTA 9 eram oriundas da Serra da Canastra, 1 amostra em São Paulo e 3 amostras do comércio, e as respectivas proporções estão apresentadas nas **Figuras 11, 12 e 13** abaixo.

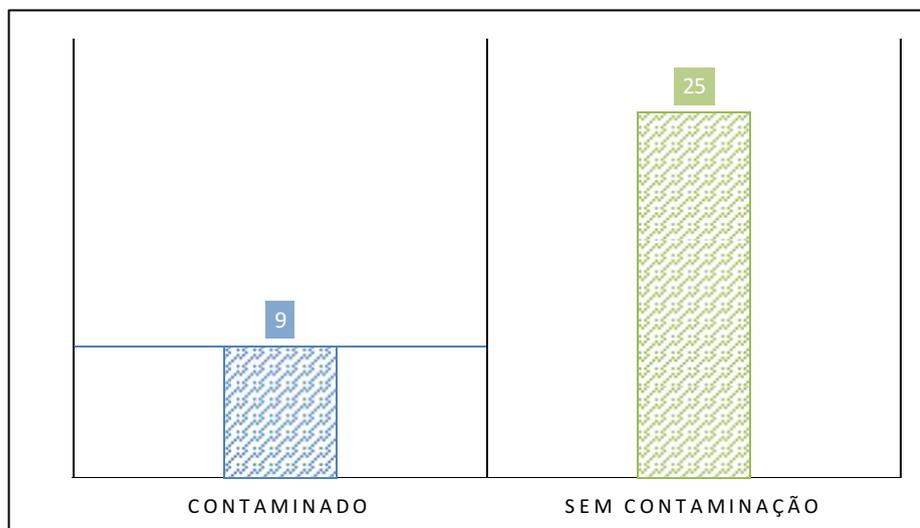


Figura 11 - Relação amostras contaminadas e não contaminadas coletadas na Serra da Canastra - MG

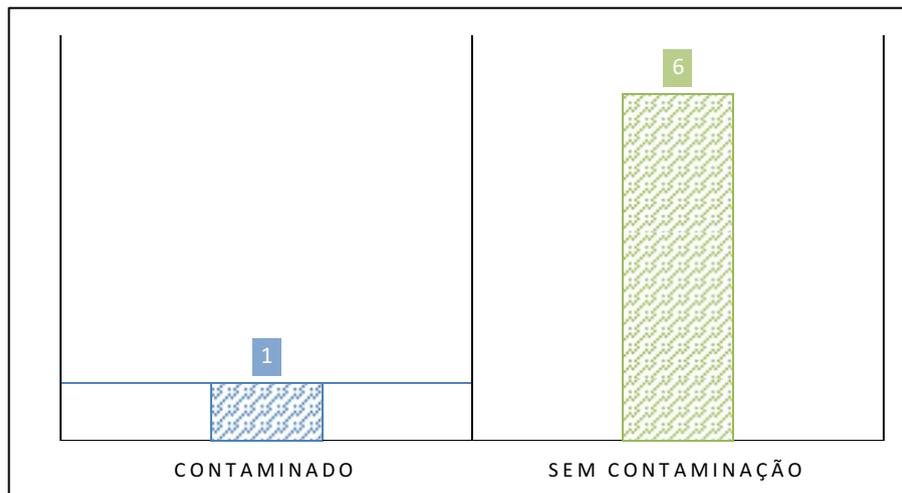


Figura 12 - Relação amostras contaminadas e não contaminadas coletadas em São Paulo

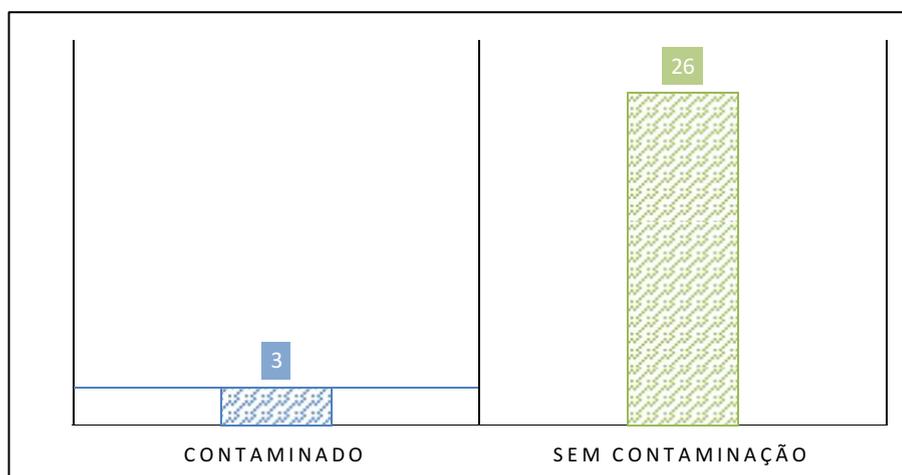


Figura 13 - Relação amostras contaminadas e não contaminadas coletadas no comércio

Outro ponto a ser considerado em relação à contaminação de OTA foi o ambiente de armazenamento. Mais de 50% das amostras contaminadas eram armazenadas em um ambiente chamado de “Caverna”, que consiste em um local sem luz, no subsolo, alguns com temperatura controlada, mas geralmente são locais mais frios e a presença de fungos estava visível nas bancadas onde os queijos foram colocados, como mostra a **Figura 14**.



Figura 14 - Queijos armazenados em cavernas (“cave cheese”).

Altafini et al., (2021), analisou em seu estudo 84 amostras de queijos de tipos variados, sendo destacado que em quatro amostras foram apresentados níveis de concentração de OTA variando de 1,3 a 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Já o estudo desenvolvido por Pietri et al., (2022) avaliou 107 amostras de queijos ralados obtendo 48,6% de amostras contaminadas e uma faixa de variando entre 11 e 370 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Comparando os dados dos 2 autores com o dado obtido nesse estudo pode-se verificar que a faixa de valores de OTA encontrados nos queijos contaminados avaliados foram muito superiores aos encontrados e citados pelos autores, mostrando a importância de se avaliar esses parâmetros

5.5 Análise da produção de ocratoxina A (OTA) em meio YESA.

Forem selecionadas e testadas 7 representantes de *A. section Circumdati* para a produção de OTA no meio YESA, sendo essas cepas um grupo representativo das cepas isoladas durante a pesquisa realizada, conforme mostra a **Tabela 7**. As cepas escolhidas foram as que tinham características de *A. section Circumdati* produtores de OTA. A **Figura 15** mostra o pico cromatográfico de OTA das cepas no tempo de 10.2 minutos (A), confirmado pelo padrão de OTA (B).

Todas as cepas apresentaram se positivas para a produção de OTA no meio YESA. Dessa forma, foi necessário a identificação das espécies utilizando ferramentas moleculares, para que o diagnóstico seja feito de forma precisa.

Tabela 7 - Detecção da produção de ocratoxina A (OTA) no meio YESA.

Código do fungo	Código da amostra	Local de coleta	OTA (µg/kg)
44	AR07	Serra da Canastra – MG	+
266	QA30	Serra da Canastra – MG	+
344	QA29	Serra da Canastra – MG	+
361	QA27	Serra da Canastra – MG	+
389	AR19	São Paulo	+
408	RG21	São Paulo	+
430	QA50	São Paulo	+

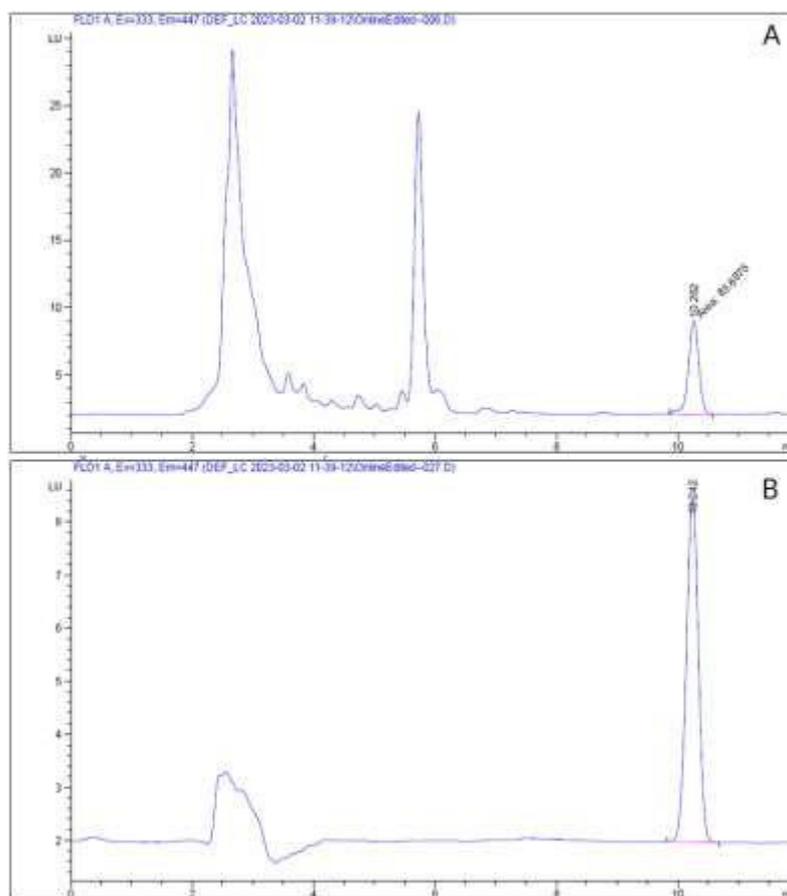


Figura 15 - Detecção de OTA na amostra 266 (A), e do padrão de OTA (B).

5.6 Caracterização dos representantes das cepas de *Aspergillus section Circumdati*.

As cepas representantes de *Aspergillus section Circumdati* foram submetidas a uma identificação molecular à nível de espécie. A **Tabela 8** e a **Figura**

16 mostram de onde essas cepas foram isoladas e sua respectiva identificação a nível de espécie.

Tabela 8 - Cepas representantes analisadas molecularmente

Código do fungo	Tipo da amostra de isolamento	Local de coleta	Identificação
44	Ar	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
267	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
285	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus ostianus contigo</i>
314	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
315	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
316	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
344	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
346	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
356	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
357	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
358	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
361	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
365	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>
370	Queijo	Serra da Canastra - MG	<i>Aspergillus elegans</i> ou <i>A. steynii</i>
430	Queijo	São Paulo	<i>Aspergillus westerdjikiae contigo</i>

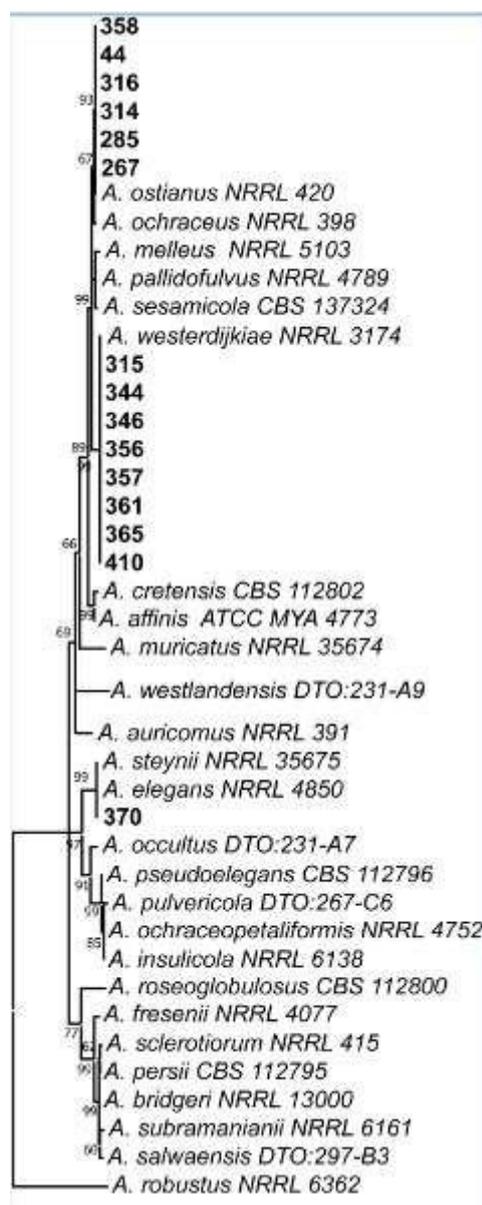


Figura 16 - Árvore Filogenética

Os fungos filamentosos da espécie *Aspergillus westerdijkiae* contigo foram os mais recorrentes dentro da amostra representativa dos isolados do grupo *A. section Circumdati*, entretanto também foi encontrado *A. ostianus* ambos são conhecidos como produtores de OTA. Em relação a amostra 370 foi classificada como *A. Elegans* ou *A. Stenii*, pois somente com a utilização do marcador beta calmodulina não foi possível identificar com precisão a espécie, sendo necessário repetir a análise com outros tipos de marcadores. A amostra 408 apesar de produzir OTA quando testada em meio YESA (como descrito na **tabela 7** anteriormente),

não pertence ao grupo A. section circumdati e assim como a amostra 370, necessita de novas análises com a utilização de outros marcadores.

5.7 Análise de gordura

As análises de gordura são utilizadas pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para classificação dos queijos, além de ter correlação direta com o teor de umidade, fatores importantes no crescimento e desenvolvimento de microrganismos e das reações químicas que ocorrem nos queijos. Os resultados das análises de gordura nos queijos estão apresentados na **Tabela 9**. A classificação dos queijos seguiu as diretrizes dispostas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) na Portaria 146, de 07/03/1996 onde são classificados como: Desnatados (0 - 9,9%), Magros (10,0 - 24,9%), Semi-gordos (25,0 - 44,9 %), Gordos (45,0 - 59,9) e Extra gordos (a partir de 60%).

Tabela 9 - Teor de gordura das amostras e suas respectivas classificações.

Código da amostra	Teor de gordura (%)	Classificação
QA1	30,35	Semi-gordo
QA2	15,16	Magros
QA3	18,46	Magros
QA4	27,14	Semi-gordo
QA5	31,93	Semi-gordo
QA6	21,91	Magros
QA7	30,26	Semi-gordo
QA8	17,93	Magros
QA9	39,49	Semi-gordo
QA10	31,85	Semi-gordo
QA11	31,80	Semi-gordo
QA12	39,29	Semi-gordo
QA13	33,91	Semi-gordo
QA14	35,18	Semi-gordo
QA15	35,66	Semi-gordo
QA16	30,35	Semi-gordo
QA17	>40	Gordo ou extra gordo
QA18	>40	Gordo ou extra gordo
QA19	>40	Gordo ou extra gordo
QA20	>40	Gordo ou extra gordo

QA21	>40	Gordo ou extra gordo
QA22	21,93	Magros
QA23	31,39	Semi-gordo
QA24	24,87	Magros
QA25	30,91	Semi-gordo
QA26	>40	Gordo ou extra gordo
QA27	39,62	Semi-gordo
QA28	>40	Gordo ou extra gordo
QA29	35,24	Semi-gordo
QA30	34,68	Semi-gordo
QA31	>40	Gordo ou extra gordo
QA32	19,95	Magros
QA33	25,02	Semi-gordo
QA34	22,60	Magros
QA35	30,26	Semi-gordo
QA36	32,05	Semi-gordo
QA37	27,63	Semi-gordo
QA38	>40	Gordo ou extra gordo
QA39	>40	Gordo ou extra gordo
QA40	>40	Gordo ou extra gordo
QA41	22,13	Magros
QA42	23,82	Magros
QA43	30,36	Semi-gordo
QA44	31,38	Semi-gordo
QA45	34,54	Semi-gordo
QA46	32,38	Semi-gordo
QA47	30,83	Semi-gordo
QA48	25,32	Semi-gordo
QA49	32,49	Semi-gordo
QA50	>40	Gordo ou extra gordo
QA51	36,32	Semi-gordo
QA52	29,19	Semi-gordo
QA53	38,29	Semi-gordo
QA54	>40	Gordo ou extra gordo
QA55	>40	Gordo ou extra gordo
QA56	>40	Gordo ou extra gordo
QA57	39,69	Semi-gordo
QA58	29,39	Semi-gordo
QA59	31,48	Semi-gordo
QA60	36,33	Semi-gordo

QA61	31,36	Semi-gordo
QA62	>40	Gordo ou extra gordo
QA63	23,68	Magros
QA64	33,88	Semi-gordo
QA65	38,68	Semi-gordo
QA66	38,39	Semi-gordo
QA67	34,25	Semi-gordo
QA68	26,80	Semi-gordo
QA69	28,73	Semi-gordo
QA70	38,51	Semi-gordo

Como a metodologia para determinação de gordura em lácteos descrita se limita a teores de até 40% devido à escala do butirômetro de Gerber, os valores que extrapolaram a escala foram classificados como Gordos ou Extra gordos, pois, devido ao tempo disponível para as análises e o fato de os dados representarem um ótimo panorama físico-químico em relação ao teor de gorduras das amostras, os dados foram mantidos utilizando este protocolo.

Segundo Gealt, Abdollahi e Evans, (1989), os lipídeos são necessários na estrutura fúngica, tendo papel importante na manutenção estrutural e funcionalidades das membranas, também é fundamental no armazenamento de energia, pois, através dos triglicérides possibilitam a produção de moléculas como hormonas que atuam como reguladores de diversas funções nos organismos e na produção de toxinas. Sendo assim o teor de gordura presente na matriz alimentar é muito importante e pode ser um fator determinante para entender melhor a produção de toxinas nos alimentos.

Outro ponto determinante seria a verificação do teor de umidade para analisar uma possível correlação dos parâmetros (teor de gordura e umidade) fiscalizados pelos órgãos fiscalizadores com o desenvolvimento de fungos filamentosos toxigênicos, entretanto as análises de umidade não foram realizadas devido ao tempo reduzido para a conclusão das análises.

5.8 Análise variância (ANOVA)

Para analisar se os níveis de contaminação por OTA encontrado nas amostras coletadas nos diferentes produtores poderiam ser consideradas iguais,

foi realizado uma análise de variância (ANOVA) com um nível de confiança de 95%, e considerando como hipótese nula (H_0) = Os grupos de amostras das fazendas analisadas não diferem estatisticamente entre si e hipótese alternativa H_1 = O nível de contaminação diferem entre as fazendas analisadas, os dados obtidos estão apresentados nas **Tabelas 10 e 11**.

Se faz importante salientar que foram utilizados os valores médios, sendo assim, as análises que foram separadas casca e parte interna foi utilizado o valor médio de contaminação das duas partes.

Tabela 10 - Dados de OTA por fazenda

Fazendas	OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)										
1	0,00	0,00	0,48	0,15	0,09	2,92	1.439,77				
2	0,00	0,30	0,00	44,63	7,01	63,09	4.060,18	3,44	11,95	545,82	
3	0,12	0,00	0,29								
4	0,00	0,00	0,06	0,06	12,81	3,33					
5	0,00	0,47	0,33	0,00							
6	0,00	0,00	0,05	0,00							
7	0,00	9,37	0,00	0,34	0,09	0,40	0,00				

Anova: fator único

Tabela 11 - Análise de ANOVA.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1601214	6	266869	0,555932	0,7619423	2,380313
Dentro dos grupos	16321318	34	480038,8			
Total	17922532	40				

(SQ = soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ = média dos quadrados; F = Teste F)

Após obter os dados da ANOVA, é possível verificar que estatisticamente ao nível de significância de 5%, aceita a hipótese nula, ou seja, as contaminações médias encontradas nos 7 produtores visitados podem ser consideradas iguais. Entretanto é importante destacar que essa análise é apenas para verificar o valor médio, para que pudesse avaliar se um grupo de amostra coletada teria sua média estatística diferente das demais. Apesar das fazendas 1 e 2 terem valores médios pontuais altos não se diferenciaram estatisticamente das outras fazendas.

6. CONCLUSÕES

O estudo da OTA em queijos artesanais é de suma importância, em especial os queijos chamados floridos e os maturados em cavernas visto a popularização do consumo desse tipo de queijo no Brasil. A OTA é uma das micotoxinas com concentração determinada por legislação para alguns alimentos no Brasil, entretanto não se tem esses parâmetros para queijos.

Este é o primeiro relato sobre a ocorrência de OTA nos queijos artesanais do Brasil, fazendo-se necessário mais estudos sobre a identificação quanto à presença de fungos filamentosos toxigênicos e da produção de ocratoxina A em queijos artesanais brasileiros.

Das 516 cepas representantes de fungos isolados nas amostras, 22% foram classificados como pertencente ao gênero *Aspergillus* e 19% do gênero *Penicillium*. Sabe-se que esses gêneros podem ter um potencial para a produção de algumas micotoxinas. Já em relação aos fungos isolados, a espécie que mais predominou pertencente ao grupo *A. section Circumdati* foi *Aspergillus westerdjikiae* contiguo.

Dentre as 70 amostras de queijos artesanais analisadas, um total, 21% das amostras estavam contaminadas com OTA, obtendo valores máximos acima de 1000 µg/kg de OTA, valor esse expressivo e que mostra uma grande produção de toxinas em determinadas amostras, sendo as maturadas em cavernas as que foram encontradas com maior taxa de contaminação de OTA.

Com isso se é importante ampliar os estudos sobre a ocorrência de OTA em queijos artesanais brasileiros e iniciar o debate sobre limites máximos de OTA nessa matriz alimentar, sobre o possível dano a saúde pública, além de formas efetivas de se evitar a contaminação por essa e outras toxinas alimentares.

7. REFERÊNCIAS

ABRAS. **Com 25% da produção nacional, MG aposta no queijo como saída para crise e geração de renda | Clipping | ABRAS**. Disponível em: <<https://www.abras.com.br/clipping/geral/67836/com-25-da-producao-nacional-mg-aposta-no-queijo-como-saida-para-crise-e-geracao-de-renda>>. Acesso em: 2 maio. 2023.

ACCENSI, F.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 623–627, 1 out. 2004.

ALEXA, E. et al. Environmental sources along natural cave ripening shape the microbiome and metabolome of artisanal blue-veined cheeses. **Research Square**, 11 ago. 2022.

ALMEIDA, E. F. L. DE; FERNANDES, M. R. **Caracterização da microrregião da Canastra como produtora de queijo Minas artesanal**. SÃO ROQUE DE MINAS: [s.n.].

ALTAFINI, A. et al. Occurrence of Ochratoxin A in Different Types of Cheese Offered for Sale in Italy. **Toxins 2021, Vol. 13, Page 540**, v. 13, n. 8, p. 540, 2 ago. 2021.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.

ANDRADE, M. A.; LANÇAS, F. M. Estado-da-arte na análise cromatográfica de Ocratoxina A em amostras de alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 1, p. 31–52, 2015.

ANDRADE, R. P. et al. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, v. 91, p. 72–79, 1 jan. 2017.

ANELLI, P. et al. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. **Food Microbiology**, v. 78, p. 62–72, 1 abr. 2019.

APROCAN. Regulamento de uso indicação Procedência Canastra, para o Queijo Minas Artesanal. 2011.

ASCOM; EMATER-MG. **Raio X: no Dia Mundial do Queijo, conheça os números da produção em Minas | Secretaria de Estado de Agricultura**,

Pecuária e Abastecimento - SEAPA. Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br/index.php/programa-alem-da-fronteira/story/4734-dia-mundial-do-queijo>>. Acesso em: 2 maio. 2023.

BARBIERI, E. et al. Bacterial diversity of traditional Fossa (pit) cheese and its ripening environment. **International Dairy Journal**, v. 23, n. 1, p. 62–67, mar. 2012.

BARRIOS, M. J. et al. FUNGAL BIOTA ISOLATED FROM SPANISH CHEESES. **Journal of Food Safety**, v. 18, n. 2, p. 151–157, 1 jul. 1998.

BESSA, D. H. R. F. et al. Atividade específica lipolítica em fungos coletados do bagaço de cana-de-açúcar. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 2, p. 395–406, 26 mar. 2021.

BORELLI, B. M. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1115–1119, 21 nov. 2006.

BRASIL. PORTARIA Nº 146 DE 07 DE MARÇO DE 1996. . 7 mar. 1996.

BRASIL. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018 - selo ARTE. . 14 jun. 2018.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico - Distribuição temporal dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos – Brasil**, Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/distribuicao-temporal-dos-surtos-notificados-de-doencas-transmitidas-por-alimentos-2013-brasil-2007-2015.pdf/view>>. Acesso em: 2 maio. 2023.

BRASIL. **Surtos de Doenças de Transmissão Hidrica e Alimentar no Brasil Informe 2022**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022>>. Acesso em: 2 maio. 2023a.

BRASIL. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 722, DE 1º DE JULHO DE 2022. . 1 jul. 2022 b.

CAMPOS, L. H. **Nova lei regulamenta produção e abre mercado para o queijo artesanal em Minas - Economia - Estado de Minas**. Disponível em: <https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2020/08/19/internas_economia,117>

7537/nova-lei-regulamenta-producao-abre-mercado-para-queijo-artesanal-minas.shtml>. Acesso em: 2 maio. 2023.

CASTRO, R. D. DE. **QUEIJO MINAS ARTESANAL FRESCO DE PRODUTORES NÃO CADASTRADOS DA MESORREGIÃO DE CAMPO DAS VERTENTES-MG: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO**. Dissertação —Belo Horizonte: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 10 fev. 2015.

CATHEY, C. G. et al. Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M1 in milk. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 5, p. 1223–1231, 1994.

CHAISE, B. **Caminho do Queijo reúne queijarias premiadas no interior paulista | Viagem e Turismo**. Disponível em: <<https://viagemeturismo.abril.com.br/brasil/caminho-do-queijo-reune-queijarias-premiadas-no-interior-paulista/>>. Acesso em: 2 maio. 2023.

CHU, F. S.; WILSON, B. J. Studies on Ochratoxins. <http://dx.doi.org/10.3109/10408447309025706>, v. 2, n. 4, p. 499–524, 2008.

COLLINS, J. D. et al. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). **EFSA Journal**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2011.

CORRÊA, A. A. S.; QUINZANI, S. S. P.; CAPOVILLA, V. M. **QUEIJO ARTESANAL DA SERRA DA CANASTRA, PATRIMÔNIO CULTURAL BRASILEIRO. Encontro Estadual da História da ANPUH-SP**, v. XXII, 2014.

DALL'ASTA, C. et al. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 729–734, 15 jan. 2008.

DELAVENNE, E. et al. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 247–251, 2 dez. 2011.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. **EFSA Journal**, v. 2, n. 3, 1 mar. 2004.

FOX, P. F. et al. Preface to the third edition. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, v. 1, n. C, p. 17, 2004.

FRISVAD, J. C. et al. **New ochratoxin A producing species of Aspergillus section Circumdati**. [s.l: s.n.].

GEALT, M. A.; ABDOLLAHI, A.; EVANS, J. L. Lipids and lipoidal mycotoxins of fungi. **Current topics in medical mycology**, v. 3, p. 218–247, 1989.

HONG, S. B. et al. Novel Neosartorya species isolated from soil in Korea. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. Pt 2, p. 477–486, fev. 2006.

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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos - Secretaria da Saúde - Governo do Estado de São Paulo. Em: ODAIR ZENEBO; NEUS SADOCCO PASCUET; PAULO TIGLEA (Eds.). 4. ed. São Paulo: [s.n.].

IPHAN. **Modo artesanal de fazer queijo de Minas: Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre (Alto Paranaíba)**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minis_web.pdf> . Acesso em: 2 maio. 2023.

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R. Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 235–239, 1 mar. 2013.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7. ed. [s.l.] Springer Science Business Media, 2005.

KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, p. 40–49, 1 jun. 2019.

KLICH, M. A. Identification of common Aspergillus species. p. 116, 2002.

KOKKONEN, M.; JESTOI, M.; RIZZO, A. Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 5, p. 449–456, maio 2005.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A - PubMed. p. 179–248, set. 1989.

MADIGAN, M. T. ET AL. **Microbiologia De Brock**. 14. ed. [s.l.] Artmed, 2016.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1–2, p. 131–139, 20 out. 2007.

MAGNOLI, C. et al. Ochratoxin A and the occurrence of ochratoxin A-producing black aspergilli in stored peanut seeds from Córdoba, Argentina. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 14, p. 2369–2373, nov. 2006.

MARTIN, J. G. P. et al. Seasonal variation in the Canastra cheese mycobiota. **Frontiers in microbiology**, v. 13, 3 fev. 2023.

MINAS GERAIS. Portaria nº 1736, de 27 de julho de 2017. 27 jul. 2017.

MINAS GERAIS. Portaria nº 1810, de 24 de abril de 2018. 24 abr. 2018.

MINAS GERAIS. Portaria nº 1969, de 26 de março de 2020. 26 mar. 2020.

MINAS GERAIS. Resolução SEAPA nº 42, 27 de dezembro de 2022. . . 27 dez. 2022.

NETTO, M. M. **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP A GEOGRAFIA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL**. [s.l: s.n.].

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Survey of aflatoxin M1 in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil. <http://dx.doi.org/10.1080/19393210.2010.538934>, v. 4, n. 1, p. 57–60, mar. 2011.

OLIVEIRA, L. G. **CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DURANTE A MATURAÇÃO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DE PRODUTORES CADASTRADOS DA MESORREGIÃO DE CAMPO DAS VERTENTES-MG**. Belo Horizonte: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2014.

OZTURKOGLU BUDAK, S. et al. The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 58, p. 50–53, 1 jul. 2016.

PATTONO, D. et al. Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 54–57, 1 set. 2013.

PERIN, L. M. et al. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, 1 ago. 2017.

PIETRI, A. et al. Ochratoxin A and Sterigmatocystin in Long-Ripened Grana Cheese: Occurrence, Wheel Rind Contamination and Effectiveness of Cleaning Techniques on Grated Products. **Toxins 2022, Vol. 14, Page 306**, v. 14, n. 5, p. 306, 27 abr. 2022.

PINEDA, A. P. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: Diversity, Microbiological Safety, and Challenges for the Sector. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 666922, 20 abr. 2021.

PINTO, M. S. **DIAGNÓSTICO SOCIOECONÔMICO, CULTURAL E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 18 fev. 2004.

PIRES, M. C. S. **Memória e Arte do Queijo do Serro: o Saber Sobre a Mesa**. 1. ed. [s.l.] Editora UFMG, 2013.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. **Fungi and Food Spoilage**, p. 1–519, 2009.

PITT, J. I. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species, 2nd edn. North Ryde, N.S.W.: CSIRO Division of Food Research. 1988.

PRADO, G. ET AL. Aflatoxin M1 in samples of “minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte - Minas Gerais/Brazil. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, 2000.

RESENDE, M. DE F. S. DE. QUEIJO MINAS ARTESANAL DA SERRA DA CANASTRA: INFLUÊNCIA DA ALTITUDE E DO NÍVEL DE CADASTRAMENTO DAS QUEIJARIAS NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS. 2010.

RESENDE, M. F. S. et al. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidolácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, dez. 2011.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 126–131, jan. 2010.

SAMSON, R. A. et al. **Food and Indoor Fungi**. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010. Disponível em: <<https://pure.knaw.nl/portal/en/publications/food-and-indoor-fungi>>. Acesso em: 2 maio. 2023

SÃO PAULO. Legislação: Resolução SAA - 30, de 24/09/2001 | Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. 24 set. 2001.

SÃO PAULO. Lei nº 17.453, de 18 de novembro de 2021 - Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo. 18 nov. 2021.

SÃO PAULO. Decreto nº 66.523, de 23 de fevereiro de 2022 - Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo. 23 fev. 2022.

SCHMIDT-HEYDT, M. et al. The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. **Food Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 233–241, 1 abr. 2012.

SERTÃO BRÁS. **Queijos brasileiros, injustamente desconhecidos e pouco apreciados**. Disponível em: <<https://www.sertaobras.org.br/2013/09/23/queijos-brasileiros-injustamente-desconhecidos-e-pouco-apreciados/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

SILVA, A. R. P. DA et al. Ochratoxin A and related fungi in Brazilian black pepper (*Piper nigrum* L.). **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 142, 1 abr. 2021.

SIMON, P. Ochratoxin and Kidney Disease in the Human. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 15, n. 3, p. 239–249, 2008.

SOBRAL, D. et al. Queijos artesanais de Minas, nem todos são QMA: uma breve revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 1, p. 55–67, 25 abr. 2022.

SORIO, A. **Cadeia Agroindustrial do Leite no Brasil**. Brasília: [s.n.]. . Acesso em: 2 maio. 2023.

TANIWAKI, M. H.; VAN DENDER, A. G. F. Occurrence of Toxigenic Molds in Brazilian Cheese. **Journal of food protection**, v. 55, n. 3, p. 187–191, 1 mar. 1992.

VAN EGMOND, H. P.; PAULSCH, W. E. Determination of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 315–326, 1 jan. 1986.

ZACARCHENCO, P. B. et al. Bolors e leveduras em queijos. **Revista Leite e Derivados**, p. 92–99, set. 2011.