

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Centro de Ciência e Tecnologia de Alimentos – CCQA

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

FERNANDA ZANTEDESCHI RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.*
ISOLADOS DE QUEIJOS ARTESANAIS**

CAMPINAS

2024

FERNANDA ZANTEDESCHI RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *ASPERGILLUS SPP.* E *PENICILLIUM SPP.*
ISOLADOS DE QUEIJOS ARTESANAIS**

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

Aluno: Fernanda Zanredeschi Rodrigues

Orientador: Marta Hiromi Taniwaki

Co-orientador: Josué José da Silva

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno
Fernanda Zantedeschi Rodrigues e orientada pelo Prof(a). Dr(a). Marta Hiromi
Taniwaki.

CAMPINAS

2024

Agências: O presente trabalho foi realizado com financiamento da **FAPESP N° do proc.: 2021/07937-4; 2022/11825-0** e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

FICHA CATALOGRÁFICA

ELABORADA PELA BIBLIOTECÁRIA VANGRI DE OLIVEIRA CAMARGO, CRB/8 6919

R696i Rodrigues, Fernanda Zantedeschi

Identificação molecular de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. isolados de queijos artesanais / Fernanda Zantedeschi Rodrigues. Campinas, 2024. 42 fls.

Orientador: Marta Hiromi Taniwaki Co-orientador: Josué José da Silva
Dissertação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos- ITAL

1. Queijo artesanal. 2. Fungos. 3. Identificação molecular. 4. Biodiversidade. I. Taniwaki, Marta Hiromi II. Silva, Josué José da III. Título

CDD637.3

Título em inglês: Molecular identification of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. isolated from artisanal cheese

Key-words: artisanal cheese, fungi, molecular identification, biodiversity

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Marta Hiromi Taniwaki (orientadora), Beatriz Thie Iamanaka (titular), Mariana Corrêa de Souza (titular), Marcelo Morgano (suplente)

Data da Defesa: 08 de agosto de 2024

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Fernanda Zantedeschi Rodrigues, aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de agosto de 2024.

Prof.(a) Dr.(a) Marta Hiromi Taniwaki
ITAL/CCQA – Presidente

Prof. Dr. Josué José da Silva
ITAL/CCQA - co-orientador

Prof. (a) Dr.(a) Beatriz Thie Iamanaka
ITAL/CCQA – titular

Prof. (a) Dr.(a) Mariana Corrêa de Souza
ITAL/CCQA – titular

Prof. Dr. Marcelo Antonio Morgano
ITAL/CCQA – 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 a minha família, especialmente meus pais, Glaucia e Jadiel, por sempre me incentivarem a estudar e por me apoiarem em todas as minhas decisões.

A professora orientadora Dra. Marta Hiromi Taniwaki e ao coorientador Dr. Josué José Da Silva por todos os conhecimentos e ensinamentos compartilhados, pela paciência, apoio e dedicação durante o desenvolvimento do projeto, e ao me proporcionarem essa oportunidade.

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (capes) que auxiliou este trabalho com bolsa concedida.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), e seus profissionais do Centro de Qualidade e Ciência de Alimentos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (CCQA), que contribuíram com seus conhecimentos, tempo e ajuda concedidos.

Aos produtores das fazendas e comércios de queijos colaboradoras, onde foram feitas as coletas das amostras, que sempre participaram, apoiaram e incentivaram como muita receptividade e carinho.

Aos colegas Caio Vinicius Marcelão e Mariana Correa pela colaboração, pelos conhecimentos compartilhados e pela ajuda durante todo o projeto.

RESUMO

Queijos artesanais são produzidos e consumidos em diversas regiões do mundo, sendo o Brasil o quarto maior produtor. Os estados de Minas Gerais e São Paulo são as principais regiões de produção de queijos artesanais no país. A microbiota presente nesses alimentos é de grande importância, as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* podem contaminar durante a maturação e causar deterioração, alterando sabores e texturas. Alguns fungos toxigênicos produzem micotoxinas, que podem ser cancerígenas, mutagênicas à saúde humana. Este estudo tem como objetivo identificar os fungos em queijos, utilizando técnicas moleculares para caracterizar a biodiversidade fúngica do queijo e das câmaras de maturação em diferentes locais de coleta. Um total de 184 cepas, sendo 93 do gênero *Aspergillus* e 92 de *Penicillium* foram identificadas molecularmente utilizando o sequenciamento do tipo Sanger com os genes CaM e BenA para *Aspergillus*, e os primers CF1 e CF4 e BT2A e BT2B para *Penicillium*. As espécies mais frequentes entre as espécies de *Penicillium* foram: *Penicillium biforme* (30%), *P. copticola* (12%) e *P. brevicompactum* (9%). Dentre as espécies de *Aspergillus* foram: *A. tennesseensis* (30%), *A. amoenus* (24%), e *A. westerdijkiae* (20%). A partir desses resultados, foi possível observar a variação na diversidade de espécies nas amostras de queijo artesanal, ar e raspagem dos diferentes produtores coletados de Minas Gerais e São Paulo.

Palavras-chave: Queijo artesanal; Fungos; Identificação molecular; Biodiversidade

ABSTRACT

Artisanal cheeses are produced and consumed in several world regions, with Brazil being the fourth largest producer. The states of Minas Gerais and São Paulo are the country's main regions of artisanal cheese production. The mycobiota present in these foods are of great importance; species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* can contaminate during ripening and cause deterioration, altering flavors and textures. Some toxigenic fungi produce mycotoxins, which can be carcinogenic and mutagenic to human health. This study aims to identify fungi in cheeses, using molecular techniques to characterize the fungal biodiversity of cheese and ripening rooms in different collection sites. A total of 184 strains, 93 of the genus *Aspergillus* and 92 of *Penicillium*, were molecularly identified using Sanger-type sequencing with the CaM and BenA genes for *Aspergillus*, and the primers CF1 and CF4 and BT2A and BT2B for *Penicillium*. The most frequent among the *Penicillium* species were: *Penicillium biforme* (30%), *P. copticola* (12%) and *P. brevicompactum* (9%). Among the *Aspergillus* species were: *A. tennesseensis* (30%), *A. amoenus* (24%), and *A. westerdijkiae* (20%). From these results, it was possible to observe the variation in species diversity in the samples of artisanal cheese, air, and scrapings from the different producers collected from Minas Gerais and São Paulo.

Key words: Artisanal cheese; Fungi; Molecular identification; Biodiversity

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Origem das cepas	25
4.2 Extração do DNA genômico	25
4.3 Identificação molecular dos isolados	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O queijo é um dos alimentos processados mais antigos registrados na história da humanidade (BORELLI *et al.*, 2016). Uma das principais teorias sobre como se iniciou a produção de queijos artesanais no Brasil, se dá ainda no período colonial, nas regiões de São Paulo e Minas Gerais. O principal fator foi a colonização dos portugueses, que transmitiram seus conhecimentos sobre as técnicas de produção aos nativos da região (BORELLI *et al.*, 2016).

Hoje o estado de Minas Gerais é conhecido por ser o maior produtor de queijo, trazendo uma grande importância social e econômica para todo o país. Produzido através de receitas familiares, e fabricado em pequenas escalas utilizando-se o leite cru, foi dado o nome de “queijos artesanais”, e hoje é um dos queijos mais comercializados no Brasil (MACHADO *et al.*, 2004 BORELLI *et al.*, 2016).

Existem outros estados que produzem queijos artesanais, como São Paulo, onde produtores têm investido em inovações, utilizando leite de diversas espécies bovino e caprinos, e desenvolvendo suas próprias formulações, inspirados nos queijos europeus finos. Esses queijos são conhecidos como queijos autorais, produzidos por pequenos produtores. São também inspirados nas receitas europeias, como francesas, alemães, espanhóis e italianos. Estes tipos de queijos têm ganho um alto valor, alcançando o mercado gourmet.

O alto teor de umidade dos queijos artesanais, relacionado às condições higiênicas insatisfatórias de processamento, manipulação, transporte e estocagem, são propensos a microrganismos patogênicos e deteriorantes. Essas condições podem gerar uma questão de saúde pública de alto risco, por ser um produto muito comercializado e consumido pela população brasileira (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; REZENDE *et al.*, 2013).

Existe uma lacuna no conhecimento sobre o perfil microbiológico do queijo artesanal, especialmente no que diz respeito aos fungos filamentosos e leveduras. Por um lado, os fungos contribuem para o *terroir* das regiões produtoras, mas por outro, pode causar alguma preocupação na saúde dos consumidores, devido a possível presença de fungos toxigênicos. Esse aspecto desperta um interesse dos produtores, pois compreender os efeitos desses microrganismos na maturação do queijo poderá levar a melhorias em todas as fases de fabricação e capacitação dos produtores, aprimorando a qualidade do produto final, garantir a segurança microbiológica e, conseqüentemente, expandir o mercado (ARAGÃO, 2018).

De acordo com MONTEL *et al.* (2014) a principal preocupação na cadeia dos queijos artesanais é preservar a diversidade microbiana natural, com o intuito de explorar os benefícios que ela pode proporcionar, sem comprometer a segurança do produto. Estudos conduzidos com Queijos Minas Artesanais (QMA) provenientes das microrregiões do Serro e Serra da Canastra,

têm caracterizado a microbiota encontrada nesses produtos, a qual é capaz de influenciar suas características sensoriais por meio da atividade de enzimas lipolíticas e proteolíticas, além da fermentação da lactose. No entanto, até o momento, poucos trabalhos têm sido realizados que avaliem a diversidade de fungos filamentosos, incluindo a presença de fungos toxigênicos e micotoxinas nos queijos artesanais (BORELLI *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2017).

As técnicas moleculares atuam como ferramentas poderosas para auxiliar na detecção e identificação de fungos. O código de barras de DNA é uma ferramenta molecular de comunicação universal empregada para a identificação de espécies. Ela se baseia na utilização de sequências curtas e padronizadas do genoma, permitindo uma rápida e precisa identificação das espécies por meio da comparação com sequências de espécies já conhecidas depositadas em um banco de dados global (HEBERT *et al.*, 2003a, 2003b).

É importante que haja um controle de qualidade rígido durante todas as fases de processamento, começando na qualidade do leite, no processamento até o produto final. De acordo com a legislação brasileira, esses queijos devem possuir uma inocuidade microbiológica comprovada, e sua composição química adequada, contudo, essas condições nem sempre são acatadas pelos produtores, interferindo na segurança do alimento (CASTILHO *et al.*, 2019; FERRAZ *et al.*, 2021).

Desse modo, o presente estudo tem como objetivo utilizar técnicas moleculares para identificar os fungos filamentosos, presentes nos queijos artesanais, das regiões dos estados de São Paulo e de Minas Gerais.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo isolar e identificar molecularmente, os fungos filamentosos isolados das amostras de queijos artesanais das regiões de Minas Gerais e de São Paulo, a fim de prospectar a diversidade das comunidades fúngicas na cadeia produtiva dos queijos artesanais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FUNGI AND TOXINS IN BRAZILIAN ARTISANAL CHEESE: OCCURRENCE AND SIGNIFICANCE TO CONSUMER HEALTH

Fernanda Z. Rodrigues, Caio Vinicius P. Marcelão, Josué José da Silva, Marta H. Taniwaki

O artigo foi submetido à revista Brazilian Journal of Food Technology



Fungi and toxins in Brazilian artisanal cheese: Occurrence and significance to consumer health

Journal:	<i>Brazilian Journal of Food Technology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Review / Artigo de Revisão
Keyword:	Fungi, Mycotoxins, Artisanal cheese, Molecular techniques, toxigenic fungi, food safety, food mycology

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjft-scielo>

FUNGI AND TOXINS IN BRAZILIAN ARTISANAL CHEESE: OCCURRENCE AND SIGNIFICANCE TO CONSUMER HEALTH

Fernanda Z. Rodrigues¹, Caio Vinicius P. Marcelão¹, Josué José da Silva¹,
Marta H. Taniwaki¹

¹ Institute of Food Technology – ITAL – Campinas – SP

Abstract

Brazil ranks fourth cheese market in the world. The Serra da Canastra region in Minas Gerais, is one of Brazil's most important areas for producing artisanal cheeses. Canastra cheese is typically manufactured without heat treatment of the milk; therefore, it is very susceptible to microbial contamination, including filamentous fungi. While research on artisanal cheeses has focused mainly on the bacterial community, the mycobiota (fungal microbiome), remains poorly investigated. Filamentous fungi, such as the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, are frequent in food products; some of their species can cause spoilage and/or produce mycotoxins, thus representing a risk to consumer health. Although these genera have been found in artisanal cheeses in previous studies, more comprehensive studies using molecular techniques are needed to clarify the fungal biodiversity of Canastra cheeses. Furthermore, data on the occurrence of mycotoxins in this type of cheese are scarce. This review aimed to analyze the mycobiota and possible mycotoxins in artisanal cheeses, focusing on Canastra cheese, and to consider the implications for food safety and public health.

Introduction

Brazil produces around 47,726.86 tons of cheese per year, ranking 53rd among the largest cheese producers in the world (FAO, 2024). Especially in Minas Gerais, producing artisanal cheeses is an activity of great economic and cultural relevance for the region (Dargère et al., 2023; Costa et al., 2022). The state has 15 regions identified as producing artisan cheeses: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Diamantina, Serra do Salitre, Serro, Triângulo Mineiro, Serras da Ibitipoca, Alagoa, Mantiqueira de Minas, Serra Geral do Norte de Minas, Vale do Jequitinhonha and Vale do Suaçuí (Brazil, 2023). There are physicochemical variations in the moisture content, pH and ripening indices of these cheeses in Minas (Dargère et al., 2023). Although artisanal cheese production contributes to local economies and maintains cultural heritage, concerns about

microbiological safety regarding raw milk cheeses remain (Pineda et al., 2021). Continuous monitoring and sanitary rigor are necessary to guarantee the quality and safety of these products.

Cheese is an excellent substrate for mold growth. It can become moldy during the ripening process and refrigerated storage. Filamentous fungi, mainly those of the genera *Penicillium* and *Aspergillus*, play an essential role in cheese production but can also be hazardous. According to Decontardi et al. (2018), potentially toxigenic fungi have been isolated from Italian grana cheese, including species of *A. flavus*, *P. crustosum* and *P. verrucosum*. However, cheese is generally considered unfavorable for mycotoxin production, such as patulin, penicilic acid and PR toxin, because these toxins react with amino acids and compounds containing sulfhydryl groups, becoming unstable in cheese (Lieu & Bullerman, 1977; Hymery et al., 2014). On the other hand, species of fungi producing ochratoxin A, sterigmatocystin, are stable and have been found in some cheeses (Hymery et al., 2014). *P. roqueforti* and *P. camemberti*, are added to cheeses as ripening cultures to enhance flavor through proteolytic and lipolytic activities (Chavez et al., 2011). The dual role of fungi in cheese production requires careful management to balance the beneficial effects and potential risks in producing this important food (Metin, 2018).

The aim of this work was to review the occurrence of fungi in Brazilian artisanal cheeses, focusing on their capacity to produce mycotoxins and food safety. A better understanding of the fungal communities present in these cheeses will provide a basis for assessing their benefits and risks and, in turn, will help develop strategies aimed at safer production practices without losing the rich cultural heritage related to artisanal cheesemaking.

Production of artisanal cheeses in Brazil

Cheese is considered a nutritionally rich food due to its significant amounts of proteins, calcium, phosphorus, zinc, iodine, selenium, vitamins, and lipids (O'brian & O'connor, 2004). Brazil is considered the fourth largest cheese market in the world, behind only the European Union, the USA, and Russia (SEBRAE, 2023). Cheese consumption in Brazil is approximately 5.5 kg per inhabitant per year (ABIQ, 2019, USDA, 2021).

Artisanal cheeses are typically characterized by production on a small scale, using milk produced on the farm and following traditional cheese-making techniques proper from each region (Kamimura et al., 2019). In Brazil, Minas Gerais is the largest producer of these types of cheeses.

According to the latest Agricultural Census (IBGE, 2017), 175,198 rural establishments in Brazil produce different types of artisanal cheese and cream cheese. Of these, 143,921 are managed by family farmers, who produce 149,711 tons per year. The production of all enterprises in the segment is 222,652 tons (EMBRAPA, 2021).

The national production of artisanal cheeses in Brazil began in the 18th century when the Portuguese explorers traveled to the Central region of Brazil looking for gold and introduced the practice of cheese making, based mainly on the techniques used in Portugal. Artisanal cheeses are produced throughout the Brazilian territory, predominantly by small rural producers and their families, and have great economic, cultural, and social importance (Embrapa, 2021). The state of Minas Gerais is known as a significant raw cow's milk cheesemaker in Brazil, which is traditionally ripened at room temperature (Martins et al., 2015; Oliveira et al., 2017). The manufacture of artisanal cheeses in Minas Gerais is divided into producing microregions.

Among the regions producing artisanal cheese in the state of Minas Gerais, one of the best known is the Serra da Canastra, a region that has certification of origin for its cheeses and is one of the most well-known Brazilian cheese-producing regions in Brazil and the world. Artisanal cheese production in the Serra da Canastra is the main source of income for many families in the region. It is, therefore, an activity of great socioeconomic and cultural importance (EMATER-MG, 2004). According to FIERN (2020), the production of Canastra cheeses reaches around 600 tons of artisanal cheese per year and sales by regularized producers reach approximately 81,250 units per day (CAMPOS, 2020).

The production of artisanal cheese in the Serra da Canastra region – MG was described by the Association of Canastra Cheese Producers (APROCAN, 2011) which established the following steps: (1) obtaining the raw material, which can be through mechanical or manual milking, (2) filtering process to eliminate undesirable particles, (3) adding endogenous starters, popularly known as “*Pingo*”, (4) adding rennet to promote the coagulation process, (5) after coagulation, the mass is cut with the aid of shovels or lyres and followed by (6) the stage of stirring the mass to remove the whey (draining), (7) shaping, which consists of placing the cheese mass in molds, (8) manual pressing so that the cheese takes its shape, (9) salting, where coarse salt is added to the surface parts of the cheese, and the maturation process according to the time determined on wooden shelves, as described in Figure 1 (APROCAN, 2011).

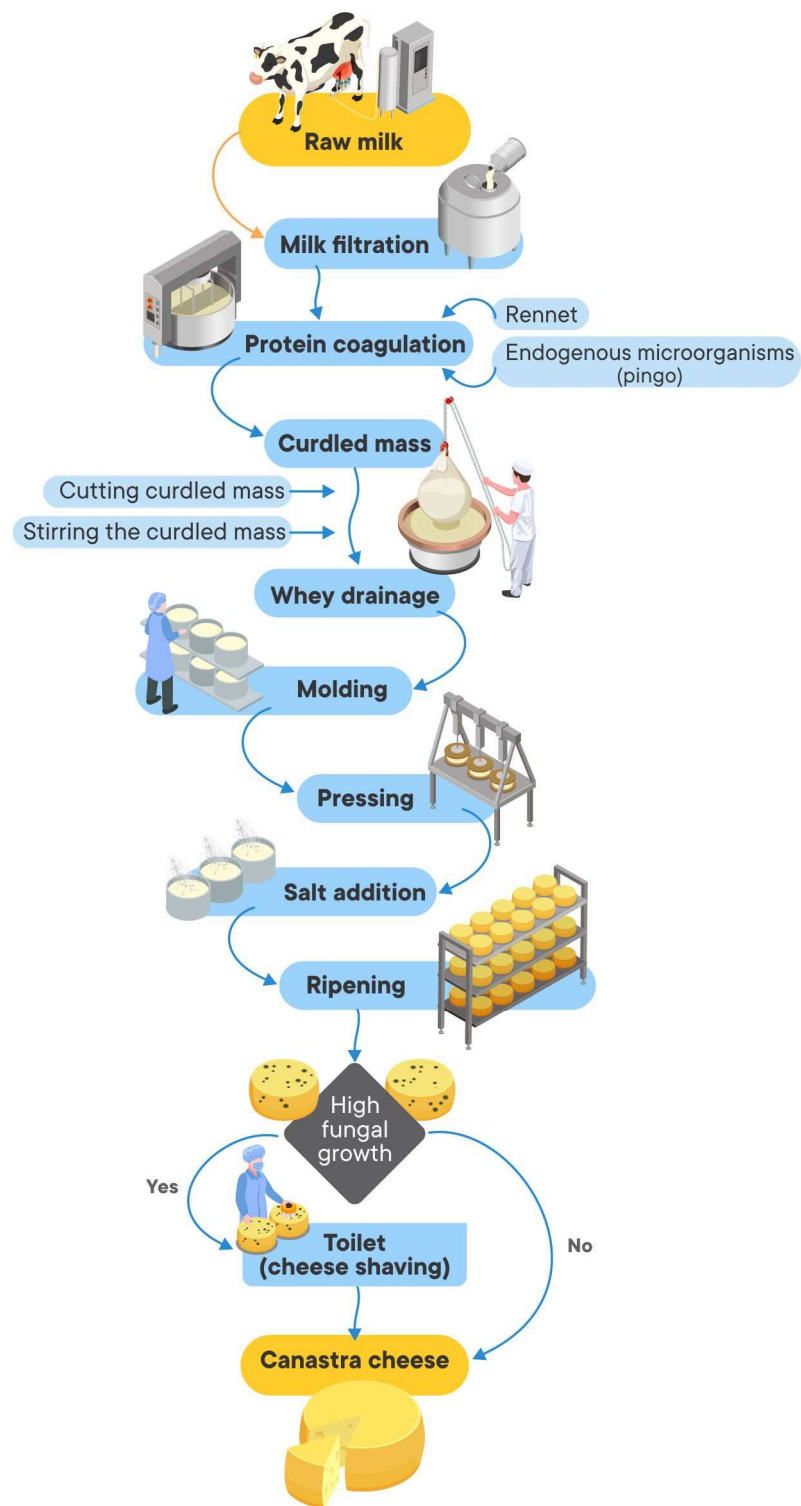


Figure 1: Fluxogram of artisanal cheese production

Pingo is a native ferment obtained from the cheese production of the previous day at the end of desorption (native whey starter). It gives identity to cheese in each region, reflecting the natural environmental settings of the raw milk used in cheese-making. *Pingo* transfers the raw milk microbiota to cheeses, directly influencing the final products' acidity, aroma, and flavor (Santos et al., 2017).

Mycobiota of artisanal cheese

The microbiota of artisanal cheese can vary greatly depending on the use of raw milk (without heat treatment) in the production process. Raw milk contains a so-called primary microbiota which, after the addition of rennet, is responsible for transforming the milk into cheese and together with the so-called secondary microbiota, both originating from endogenous dripping, provide unique sensory characteristics in cheeses, such as texture, aroma and flavor. This microbiota is composed of microorganisms such as bacteria, molds and yeasts, which contribute to the development of the sensory characteristics of the cheese during the ripening process (Pinto, 2004; Borelli et al., 2006b; Resende, 2010; Oliveira, 2014).

Cheese is generally susceptible to contamination by spoilage, pathogenic, or mycotoxin-producing microorganisms originating from milk or contaminating the finished product (Van Egmond & Paulsch, 1986; Fox et al., 2004). Several studies have investigated in depth the bacterial microbiota of Brazilian artisanal cheeses, including Canastra cheese (Perin et al., 2017; Kamimura et al., 2019; Resende et al., 2011), even reporting contamination by *Staphylococcus* (Kamimura et al., 2019; Campos et al., 2021), but there are few studies on the fungal microbiota.

Filamentous fungi are capable of growing on different substrates, as well as on cheeses. They can cause changes in quality (appearance, flavor) and pose a health risk when these fungi produce mycotoxins (Hymery et al., 2014). Contamination by undesirable fungi can occur at any stage of the artisanal cheese production chain, including fungi in raw materials. Species of the genera *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Verticillium* and *Torrubiella* have been frequently found as contaminants in milk and cheese samples (Barrios et al., 1998; Delavenne et al., 2011; Zacarchenco et al., 2011).

In some cheeses, certain species of filamentous fungi are intentionally added to increase the nutritional and sensory quality of the product during ripening. These fungi can grow inside cheeses since they tolerate higher concentrations of salt and CO₂ and can develop at low water activity (*a_w*) (Fox et al., 2004; Hymery et al., 2014). Two well-known species are *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti*, which play a significant role in cheese's appearance, texture, and characteristic flavor. These species are known for producing mycotoxins; *P. camemberti* produces

cyclopiazonic acid (CPA) and *P. roqueforti* produces roquefortine C and mycophenolic acid (MPA). However, these metabolites have low toxicity and are present in low concentrations in cheese. Due to the long history of consumption of these types of cheeses (no cases of food poisoning described in the literature), the United States and the European Union consider the use of these fungi safe, already recognized as GRAS (generally recognized as safe) by the FDA (US Food and Drug Administration). In the European Union, the EFSA (European Food Safety Authority) has acknowledged the absence of reports of adverse health effects due to the consumption of these cheeses but has not yet granted the two species the status of QPS (qualified presumption of safety), due to insufficient data on the production of mycotoxins, their toxicity and occurrence in cheeses (EFSA, 2011; Himery et al., 2014). Studies on the mycobiota of bloomy Canastra cheeses are few and require further investigation since, in this case, the process uses the natural mycobiota present in the environment.

Mycotoxins found in cheeses

Few reports are available on the occurrence of mycotoxins in artisanal cheese, but several mycotoxins have been found in cheese worldwide, as shown in Table 1. After an extensive review of possible mycotoxins and toxigenic fungi found in cheeses from various parts of the world, Himery et al. (2014) concluded that the mycotoxins of most significant risk are aflatoxin M₁ and ochratoxin A due to their greater stability and toxicity.

Aflatoxins (AFs) are among the most frequently found mycotoxins in food and feed. They are produced mainly by species of *Aspergillus* section *Flavi*. They can occur in cheese due to direct fungi contamination or from milk produced by dairy animals fed with feed contaminated with Aflatoxin B₁. Aflatoxin B₁ is metabolized in the animal, transforming into Aflatoxin M₁, which is excreted in the milk.

Aflatoxin B₁ is known to cause liver damage and is carcinogenic, classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as belonging to group 1 (carcinogenic to humans, IARC, 1993). Aflatoxin M₁ is monitored in milk and dairy products in several countries due to its toxicity potential (Cathey et al., 1994; EFSA, 2004; Hymery et al., 2014). In Brazil, Resolution RDC No. 7 of February 18, 2011, of ANVISA (National Health Surveillance Agency) established a maximum limit of 2.5 µg/kg of aflatoxin M₁ in cheeses (BRASIL, 2011). In the European Union, this maximum value for cheese is 0.05 µg/kg. In the United States, it is 0.05 µg/kg in milk intended for cheese production; in China, it is 0.5 µg/kg in milk (Hymery et al., 2014). Prado et al. (2000) evaluated samples of different cheeses produced in Minas Gerais and found an average contamination by aflatoxin M₁ of 0.36 µg/kg in samples from Serra da Canastra. Oliveira et al. (2011)

detected concentrations of aflatoxin M₁ ranging from 0.142 to 0.118 µg/kg in samples of Minas Frescal and Minas Padrão cheese produced in São Paulo.

Ochratoxin A (OTA), can be produced mainly by *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum* and *Penicillium nordicum* (Jay et al., 2006; Pitt & Hocking, 2022; Pattono et al., 2013; Anelli et al., 2019; Marcelão et al. 2024). OTA can be associated with kidney damage, as well as liver necrosis and enteritis. Due to these factors, the study of OTA production is significant for public health (Chu, 1974; Simon, 1996; Kuiper-Goodman & Scott 1989; Magnoli et al., 2006). Due to the considerable amount of NaCl introduced during the cheese salting process, microorganisms that can adapt to higher salt concentrations may develop, such as *Penicillium nordicum* and *Penicillium verrucosum*, which are OTA producers (Schmidt-Heydt et al., 2012; Hymery et al., 2014). Furthermore, these species are psychrotrophic, growing in temperate and refrigerated environments (Pitt & Hocking, 2022).

Anelli et al. (2019) found the species *Aspergillus westerdijkiae* and *Aspergillus steynii* to be OTA producers in 45% of cave cheese samples in Italy. This study detected OTA in 36% of the samples analyzed. Pattono et al. (2013) also detected the presence of OTA in semi-hard cheeses in Italy. Recently, Marcelão et al. (2024) found *Aspergillus westerdijkiae* as the most frequent species (67%), followed by *Aspergillus ostianus* (22%), *Aspergillus steynii* (11%), and approximately 22% of Brazilian artisanal cheese samples were contaminated by OTA, ranging from 1.0 to over 1000 µg/kg. This fact shows that OTA in cheeses manufactured in Brazil is a concern since the species of this group (*A. section Circumdati*) are well adapted to warmer climates and have already been isolated from Brazilian foods such as coffee, cocoa, among others (Taniwaki et al., 2003; Copetti et al., 2010). In a study carried out in Brazil by Taniwaki & van Dender (1992), OTA was not found in the cheeses analyzed. However, at the time thin layer chromatography was used for OTA detection, this technique has low sensitivity and specificity for the detection of this toxin in cheese. Other mycotoxins, such as mycophenolic acid, patulin, citrinin, PR toxin, and sterigmatocystin, have been evaluated in cheeses but are rarely found (Table 1).

Table 1: Occurrence of mycotoxins in cheese from several parts of the world.

Cheese type	Country	Mycotoxins	Total of samples/positive samples	Toxin levels (µg/Kg)	Methodology of detection	Reference
Minas frescal and padrão cheese	Brazil	AFM ₁	48/13	0.037 – 0.313	HPLC	Oliveira et al. (2011)
White cheese	Pakistan	AFM ₁	119/93	0.004 – 0.595	HPLC	Iqbal & Asi (2013)
Cream cheese	Pakistan	AFM ₁	150/89	0.004 – 0.456	HPLC	Iqbal & Asi (2013)
Italian cheese	Italy	AFM ₁	102/85	<0.025 - > 0.25	ELISA	Anfossi et al. (2012)
White cheese	Iran	AFM ₁	50/30	0.040 – 0.374	ELISA	Tavakoliet et al. (2012)
Minas frescal and padrão cheese	Brazil	AFM ₁	58/39	0.01 – 0.34	HPLC	Iha et al. (2011)
Grated Parmesan, prato, processed and hard parmesan cheeses	Brazil	Aflatoxins (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁), ochratoxin A, patulin, penicilic acid and citrinin	36/0	ND*	TLC	Taniwaki & Van Dender (1992)
Blue cheese	Finland	Roquefortin C	11/11	800 – 5,600	LC-MS	Kokkonen et al. (2005)
Blue cheese	Finland	Micofenolic acid	11/1	300	LC-MS	Kokkonen et al. (2005)
White mold (type Brie) cheese	Finland	Roquefortin C and micofenolic acid	9/9	ND	LC-MS	Kokkonen et al. (2005)
White mold (type Brie) cheese	Italy	Cyclopiazonic acid	6/6	20 – 80	HPLC	Zambonin et al. (2001)
Cave cheese	Italy	Aflatoxin (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁), patulin, sterigmatocystin	22/0	ND	HPLC	Anelli et al. (2019)
Blue cheese	Italy	Ochratoxin A	92/30	0.1 – 3.0	HPLC	Dall'Asta et al. (2008)
Cave cheese	Italy	Ochratoxin A	22/8	0.2 – 317	HPLC	Anelli et al. (2019)
Semi-hard cheese	Italy	Ochratoxin A	32/6	1 – 262	HPLC	Pattono et al. (2013)
Semi-hard cheese	Italy	Patulin	32/9	15 – 460	HPLC	Pattono et al. (2013)
Grana cheese	Italy	Ochratoxin A	107/52	<LOD – 25.05	HPLC	Pietri et al. (2022)
Grana cheese	Italy	Sterigmatocystin	107/101	<LOD – 6.87	HPLC	Pietri et al. (2022)
Artisanal cheese	Brazil	Ochratoxin A	130/28	0.3 - >1000	HPLC	Marcelão et al. (2024)

*Not Detected

Factors that affect the production of mycotoxins in cheeses

Some external and internal factors can directly interfere with the presence of fungi and the production of mycotoxins in cheeses. External conditions include temperature, oxygen availability, and relative humidity. Internal conditions include water activity, pH, and interactions between microorganisms in the cheese microbiota (Magan & Aldred, 2007).

There are several potential sources of contamination by toxigenic fungi, but one that stands out is the ambient air in production areas. Spores present in the air have the potential to contaminate

both the raw material and the surfaces and utensils used during cheese production. These spores can then germinate and give rise to mycelial growth during the ripening process under favorable environmental conditions. An additional concern is using raw milk in cheese production since fungal spores are generally resistant to high temperatures and can remain viable. Furthermore, in some instances, the brine used can serve as a reservoir for fungal spores, including species such as *P. commune* (Kure & Skaar, 2019; Decontardi et al., 2017).

Another factor that influences the development of microorganisms in cheese is the ripening time, which, in many cases, can reduce the undesirable microbiota in the final product. Borelli et al. (2006a) and Campos et al. (2021) reported a reduction in hygienic-sanitary indicator microorganisms over the ripening time of QMA samples collected and produced in the Serra da Canastra region, in some cases levels below the detection limit of the methods were found.

Another point is tolerance to salinity, which most fungi have. An example is *P. camemberti*, which grows well in saline concentrations close to 10%, and some strains of *P. roqueforti*, which can withstand concentrations of up to 20%. However, *Geotrichum candidum* is an exception because it is relatively sensitive to high salt concentrations, with its growth completely inhibited at concentrations of around 6% salt. (Martin & Cotter, 2023).

Temperature is also an essential factor that influences the growth of specific microbial groups to the detriment of others. For example, in *epoisses* cheese, the yeast *Debaromyces hansenii* can become predominant, especially at the beginning of the ripening process, due to its ability to grow at temperatures between 5 and 10 °C, among other conditions (Irlinger & Monnet, 2021; 2009).

Despite the increase in knowledge about the factors that influence the development of fungi, there are undesirable ones during the cheese ripening process, being a significant concern for artisanal cheese producers. In the United States, where the production of artisanal cheeses ripened with surface molds has recently grown, a survey conducted with 61 cheese producers revealed that 71% of them consider the increase of these unwanted surface molds as their biggest challenge (Biango-Daniels & Wolfe, 2021).

Despite the removal of fungi on the surface (cheese toilet), it is worth noting that the simple presence of fungi on the surface of the cheeses does not necessarily involve the production of mycotoxins (De Souza et al., 2021). For example, the PR toxin, produced by *P. roqueforti*, does not occur frequently in cheeses due to conditions that do not favor its production (Hymery et al., 2014).

Fungal spores found in the cheesemaking environment attach themselves to the cheese rinds, multiply and proliferate, forming several colonies of filamentous fungi and yeasts to which their vegetative or reproductive structures are exposed (Saraiva et al., 2012). For this reason, after cheese production, producers usually wash the pieces with water and dry them to remove the layers of fungi that adhere during maturation, a procedure known as “cheese toilet” (Rocha, 2004).

However, some producers prefer to keep these fungi on the cheese rinds, as they bring unique sensory aspects. Cheeses with these characteristics are known as “artisanal cheeses with bloomy rinds” and are currently highly sought after and valued nationally (Pereira et al., 2014; Kamimura et al., 2019) and internationally (Mondial du fromage et des produits laitiers, 2019) markets. However, some toxigenic fungi may be present, producing mycotoxins such as OTA (Marcelão et al., 2024) and cheese producers generally cannot recognize these fungi.

Martin & Cotter (2023) proposed periodic testing for mycotoxins such as OTA in artisanal cheeses. They also discussed whether rind removal could significantly reduce the health risk from OTA ingestion. However, they concluded that since the consumption of these rinds is routine, these recommendations are difficult to implement unless more evidence of health risks is demonstrated.

Importance of fungal identification

Correctly identifying species in cheese is a critical factor for all research. Classical studies of the mycobiota of cheese, are primarily based on phenotypic characters, using microbiological growth media in combination with morphology and physiological criteria such as: colony color, sporulation structures and ability to grow in defined environments, different water activities and temperatures (Pitt and Hocking 2022, Mueller et al., 2011, King Jr et al., 2013). Limitations of these methods are that they are time-consuming and even with taxonomic expertise, identification by phenotypic methods is commonly difficult for some genera of fungi that contain a large number of closely related species, e.g. *Aspergillus*, *Penicillium*, or *Fusarium* (Taniwaki et al., 2023).

Molecular techniques have allowed progress toward more accurate and faster results compared to phenotypic methods in the identification of fungi in artisanal cheeses. Among the most widely used molecular markers, the Internal Transcribed Spacer (ITS) region has stood out due to its good degree of variability among different fungal species — which makes it an excellent tool for species differentiation. ITS sequencing has been cited as the “universal DNA barcode for fungi” (Schoch et al., 2012) and is typically used to authenticate and identify fungal species within various food matrices, including cheeses.

Other molecular markers, such as the β -tubulin and calmodulin genes, have differentiated closely related species within the genera *Aspergillus* and *Penicillium* (Visagie et al., 2014). Molecular approaches are particularly valuable in the context of food safety, where rapid and accurate identification is crucial to avoid mycotoxin contamination. Furthermore, next-generation sequencing (NGS) technologies can provide deep insights into the microbial diversity of cheese, allowing the identification of cultivable and non-cultivable species that might otherwise go unnoticed (de Melo Pereira et al., 2022; Mayo et al., 2014). The integration of NGS with other omics approaches can

provide major advances in understanding cheese ripening processes and identify potential biomarkers for cheese quality and safety (Afshari et al., 2020).

Recently, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry has emerged as a promising tool for rapidly identifying fungi. MALDI-TOF MS analyzes the protein profiles of microorganisms, generating a unique spectral “fingerprint” for each species that can be compared to reference databases for identification (Singhal et al., 2015). As MALDI-TOF databases become more extensive, their use in routine food safety analysis will likely become more widespread, providing a rapid and cost-effective method for monitoring fungal contamination in food (Rolland et al., 2024; Quéro et al., 2019).

Fungal species must be identified in cheese not only to ensure quality but also to ensure public health. For example, *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. are some of the most common genera in the mycobiota of artisanal cheeses, and many species from these groups can produce mycotoxins, which are a real danger to the health of consumers. Among the mycotoxins, aflatoxins represent the greatest risk, a highly carcinogenic metabolite produced mainly by species of *Aspergillus* section *Flavi*, such as *A. flavus*, which are capable of contaminating dairy products through raw materials or during cheese ripening (Álvarez-Días et al., 2022; Barrios et al., 1997).

Accurate identification of fungi is essential to distinguish between species that participate in beneficial fermentation processes and those involved in spoilage and toxin production, or even to recognize their ambiguous nature. For example, *Penicillium roqueforti* is essential in the production of blue cheese, but it can produce roquefortine C and mycophenolic acid, which need to be controlled due to their potential toxicity (Chávez et al., 2011; Metin, 2023). Likewise, other species, such as *Penicillium nordicum*, a potential producer of OTA and frequently found in cheeses (Cabañes et al., 2010), need to be detected/identified for better control.

The most effective way of monitoring is to implement molecular methods (mass spectrometry and genotypic methods) to identify mycobiota in the cheese production chain. This significantly reduces the risk of mycotoxin contamination before reaching the consumer. This integrative approach is essential for artisanal cheeses produced in Brazil to meet food safety regulations and international quality standards.

Conclusion

In conclusion, the presence of filamentous fungi in Brazilian artisanal cheeses, especially those from the Serra da Canastra region, raises the need to balance the beneficial actions during ripening and the potential risks due to the production of mycotoxins. Considering that the production of Brazilian artisanal cheeses is an activity with enormous cultural and economic relevance, efforts must be dedicated to ensuring the microbiological safety of this product. These efforts must include

knowledge of fungal biodiversity and its potential for mycotoxin contamination. In this sense, contemporary molecular techniques, in particular NGS sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry, are useful tools to ensure accurate and rapid identification/detection methods for fungal species identification and can therefore direct better management strategies in the artisanal cheese industry. Future research should involve easy and rapid mycotoxin methods, including aflatoxin M1 and ochratoxin A, to ensure the microbiological safety of this product, safeguarding the production of this important national cultural heritage.

References

- Afshari, R., Pillidge, C. J., Dias, D., Osborn, A. M. & Gill, H. (2020). Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality." *Critical reviews in food science and nutrition*, 60, 33-47. doi:10.1080/10408398.2018.1512471
- Álvarez-Días, F., Torres-Parga, B., Valdivia-Flores, A. G., Quezada-Tristán, T., Alejos-De La Fuente, J. I., Sosa-Ramírez, J. & Rangel-Muñoz, E. J. (2022). *Aspergillus flavus* and total aflatoxins occurrence in dairy feed and aflatoxin M₁ in bovine milk in Aguascalientes, Mexico. *Toxins*14, 292. doi:10.3390/toxins14050292
- Anelli, P., Haidukowski, M., Epifani, F., Cimmarusti, M. T., Moretti, A., Logrieco, A. & Susca, A. (2019). Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. *Food Microbiology*, 78, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.014>
- Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., D'arco, G., Passini, C. & Giraudi, G. (2012). Occurrence of aflatoxin M1 in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. *Food Control*, 25, 123-130. doi:10.1016/j.foodcont.2011.10.027
- APROCAN (Associação dos produtores de queijo Canastra). (2011). Regulamento de uso indicação Procedência Canastra, para o Queijo Minas Artesanal. Retrieved in 2024, 5th November, from <https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/indicacoes-geograficas/arquivos/cadernos-de-especificacoes-tecnicas/Canastra.pdf>
- Barrios, M. J., Medina, L. M., Cordoba, M. G. & Jordano, R. (1997). Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* isolated from cheese. *Journal of Food Protection*, 60, 192–194. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.2.192>.
- Barrios, M. J., Medina, L. M., Lopez, M. C. & Jordano, R. (1998). Fungal biota isolated from Spanish cheeses. *Journal of Food Safety*, 18, 51-157. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.2.192>
- Biango-Daniels, M.N. & Wolfe, B. E. (2021). American artisan cheese quality and spoilage: a survey of cheesemakers' concerns and needs. *Journal of Dairy Science*, 104, 6283–6294, <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19345>.

- Borelli, B. M., Ferreira, E. G, Lacerda, I. C. A., Franco, G. R. & Rosa, C. A. (2006a). Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1115-1119. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-006-9151-3>
- Borelli, B. M., Ferreira, E. G, Lacerda, I. C.A., Santos, D. A., Carmo, L. S., Dias, R. S., Silva, M. C. & Rosa, C. A. (2006b). Enterotoxigenic *Staphylococcus* Spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 545-550. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400026>
- Brasil. (2011). Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011.
- Brasil (2023). Minas Gerais. Queijos Artesanais, Agricultura. Retrieved in 2024, 5th November, from <<https://www.mg.gov.br/agricultura/pagina/servicos/queijos-artesanais>>.
- Cabañes, F. J., Bragulat, M. R. & Castellá, G. (2010). Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins*, 2, 1111-1120. <https://doi.org/10.3390/toxins2051111>
- Campos, L. H. (2020). Nova lei regulamenta produção e abre mercado para o queijo artesanal em Minas. 2020. Retrieved in 2024, 5th November, from https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2020/08/19/internas_economia,1177537/nova-lei-regulamenta-producao-abre-mercado-para-queijo-artesanal-minas.shtml. Access on: 04th.11. 2024.
- Campos, G. Z., Lacorte, G. A., Jurkiewicz, C., Hoffmann, C., Landgraf, M., Gombossy De Melo Franco, B. D. & Pinto, U.M. (2021) Microbiological characteristics of Canastra cheese during manufacturing and ripening. *Food Control*, 121, 107598. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107598>
- Cathey, C. G., Huang, Z. G., Sarr, A. B., Clement, B. A. & Phillips, T. D. (1994). Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M1 in milk. *Journal of Dairy Science*, 77, 1223-1231. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77061-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77061-2).
- Chávez, R., Fierro, F, García-Rico, R.O. & Laich, F. (2011). Mold-fermented foods: *Penicillium* spp. as ripening agents in the elaboration of cheese and meat products. *Mycofactories*, 2011, 73-98. Bentham Science Publishers, Sharjah. DOI: 10.2174/97816080522331101010073
- Chu, F.S. (1974). Studies on ochratoxins. *Critical Review of Toxicology*, 2, 499–524. <https://doi.org/10.3109/10408447309025706>
- Copetti, M. V., Pereira, J. L., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I. & Taniwaki, M.H. (2010). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 67-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.031>.

- Costa, J. R., Pereira, D. A., de Paula, I. G., de Abreu, L. R., Pinto, S. M., Edwards, H. G. M., Stephani, R. & de Oliveira, L. F. C. (2022). The taste of a champion: Characterization of artisanal cheeses from the Minas Gerais region (Brazil) by Raman spectroscopy and microstructural analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 112, 104704. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104704>
- 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, 729–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.049>
- Dargère, A. F., Pinto, S. M., Silva, J. G., Garbossa, C. A. P., Batista, D. S., Correia, L. F., Marçal, J. O. & Faria, P. B. (2022). Lipid profile of artisanal Minas cheese from certified regions in the state of Minas Gerais, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 58, e03212. DOI: 10.1590/S1678-3921.pab2023.v58.03212
- Dargère, A. F., Pinto, S. M., Abreu, L. R., Correia, L. F., Santos, D. B., Silva, J. G., Marçal, J. O., Garbossa, C. A. P., Faria, R. A. P. G., & Faria, P. B. (2023). Artisanal Minas cheese parameters associated with regions of origin in Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 75, 395–406. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12851>.
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.L., Barbier, G. & Le Blay, G. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 247-251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.029>
- Decontardi, S., Mauro, A., Lima, N. & Battilani, P. (2017). Survey of *Penicillia* associated with Italian grana cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 246, 25–31, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.019>
- Decontardi, S., Soares, C., Lima, N. & Battilani, P. (2018). Polyphasic identification of *Penicillia* and *Aspergilli* isolated from Italian grana cheese. *Food microbiology*, 73, 137-149. doi:10.1016/j.fm.2018.01.012
- de Melo Pereira, G. V., Carvalho Neto, D. P., Maske, B. L., De Dea Lindner, J., Vale, A. S., Favero, G. R., Viesser, J., Carvalho, J. C., Góes-Neto, A. & Soccol, C. R. (2022). An updated review on bacterial community composition of traditional fermented milk products: what next-generation sequencing has revealed so far? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62, 1870-1889. doi:10.1080/10408398.2020.1848787
- EFSA (European Food Safety Authority). (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in the Food chain on a request from the request from the commission related to aflatoxin B1 substance in animal feed (Request Nr. EFSAQ- 2003–035). Adopted on 3 February 2004, EFSA J 39:1–27.

- EFSA. (2011). Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). EFSA J 9:2497–2551
- EMATER-MG (Empresa de assistência técnica e extensão rural de Minas Gerais). (2004). Caracterização da microrregião da Canastra como produtora de queijo Minas artesanal. São Roque de Minas.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2021. Queijos artesanais brasileiros. Embrapa. Retrieved in 2024, 5th November, from <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/226359/1/Queijos-artesanais-brasileiros.pdf>.
- FIERN (Federação das Indústrias do Estado do Rio Grande do Norte) (2020) O Brasil que a gente produz – Indústria de Queijos. Retrieved in 2024, 5th November, from <https://www.fiern.org.br/o-brasil-que-gente-produz-queijos/>
- FAO (Food and Agriculture Organizations of the United Nations) (2024) – FAO DATABASE. Retrieved in 2024, 5th November, from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- Fox, P., Mcsweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 3ed. Academic Press, San Diego. 640 P.
- 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, 437-456. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1993). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring 12 substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Press, Lyon*, 56, 245-295.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo agropecuário 2017: resultados definitivos. 2017. Retrieved in 2024, 5th November, from <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>
- Iqbal, S. Z. & Asi, M. R. (2013). Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 30, 235-239. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.026>
- Iha M.H, Barbosa, C.B., Okada, I.A. & Trucksess, M.W. (2011). Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. *Food Control*, 22, 971-974. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.013>
- Irlinger, F. & Mounier, J. (2009) Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 142-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>

- Irlinger, F. & Monnet, C. (2021). Temporal differences in microbial composition of 'Epoisses cheese rinds during ripening and storage, *Journal of Dairy Science*, 104, 7500–7508. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20123>.
- Jay, J. M., Loessner, M. J. & Golden, D. A. (2005). Modern Food Microbiology. 7. ed. [s.l.] Springer Science Business Media, USA.
- Kamimura, B. A., De Filippis, F., Sant'ana, A. S. & Ercolini, D. (2019) Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. *Food Microbiology*, 80, 40–49. <http://doi:10.1016/j.fm.2018.12.014>
- King Jr, A., Pitt, J.I., Beuchat, L.R. & Corry, J.E. (eds). (2013). Methods for the Mycological Examination of Food. Nato Science Series A: vol 122. Springer Science & Business Media, USA
- Kokkonen, M., Jestoi, M. & Rizzo, A. (2005). Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, 22, 449–456. <http://doi:10.1080/02652030500089861>
- Kuiper-Goodman, T. & Scott P. M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Science*, 2, 179 – 248.
- Kure, C. F. & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion on Food Science*, 29, 14–19. doi: 10.1016/j.cofs.2019.07.003
- Lieu, F.Y. & Bullerman, L.B. (1977). Production and stability of aflatoxins, penicillic acid and patulin in several substrates. *Journal of Food Science*, 42, 1222-1224. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb14465.x>
- Magan, N. & Aldred, D. (2007) Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 131-139. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034>.
- Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Fernández-Juri, M. G., Chiacchiera, S. & Dalcero, A. (2006). 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*, 86, 2369-2373. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2625>
- Marcelão, C. V. P., Souza, M. C., Silva, J. J., Couto, F. C., Lacorte, G. A., Pinto, U. M., Maffei, J. T., Zacarchenco, P. B., Iamanaka, B. T. & Taniwaki, M. H. (2024). Unveiling Ochratoxin A and Ochratoxigenic Fungi in Brazilian Artisanal Cheeses: Insights from Production to Consumption. *Food Research International*, 183, 114214. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114214>
- Martin, J. G. P. & Cotter, P. D. F. (2023). Filamentous fungi in artisanal cheeses: A problem to be avoided or a market opportunity? *Heliyon* 9, e15110 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15110>

- Martins, J. M., Galinari, E., Pimentel-Filho, N. J., Ribeiro, J. I., Furtado, M. M., & Ferreira, C. L. L. F. (2015). Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 219–230.
<https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131003>
- Mayo B., Rachid, C. T. C. C., Alegria, A., Leite, A. M. O., Peixoto, R.S. & Delgado, S. (2014). Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Current Genomics*, 15, 293-309. doi:10.2174/1389202915666140616233211.
- Metin, B. (2018). Filamentous fungi in cheese production. In: S. O. Budak & H. C. Akal (eds). *Microbial cultures and enzymes in dairy technology*. (Chapter 14, 257-275 pp). IGI Global Editors, USA. Doi: 10.4018/978-1-5225-5363-2.ch014
- Metin, B. (2023). *Penicillium roqueforti* secondary metabolites: biosynthetic pathways, gene clusters, and bioactivities. *Fermentation*, 9, 836. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090836>
- Mondial du Fromage (2021). Concours international produits. Retrieved in 2024, 5th November, from <https://www.mondialdufromage.com/concours-produits.php/>
- Mueller, G.M., Bills, G.F. & Foster, M.S. (2011) Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Elsevier, USA
- O'Brien, N. M. & O'Connor, T. P. (2004). Nutritional aspects of cheese. In: cheese: chemistry, physics and microbiology, Fox, P., Mcsweeney, P.L.H., Cogan, T.M. & Guinee, T.P. eds. p. 573-581, 3.ed. Academic Press, San Diego.
- Oliveira, L. G. (2014). 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. 2014. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- Oliveira, C. A. F., Franco, R. C., Rosim, R. E. & Fernandes, A. M. (2011). Survey of aflatoxin M1 in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 4, 57-60. <https://doi.org/10.1080/19393210.2010.538934>
- Oliveira, K. L., Farias, T. A. L., Nascimento, I. R. S., Ximenes, G. N. C., Campos, J. M., & Cortez, N. M. S. (2017). Cheese labels verification curd s type “A” and “B” in relation to the content protein and fat. *Revista Brasileira de Agrotecnologia*, 7, 110–114.
- Pattono, D., Grosso, A., Stocco, P. P., Pazzi, M. & Zeppa, G. (2013). Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. *Food Control*, 33, 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.019>
- Pereira, B. P., Vieira, T. R., Valent, J. Z., Bruzza, A., Wagner, S. A., Pinto, A. T., & Schmidt, V. (2014). Implications of the quality of the production process artisan cheese serrano. *Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET/UFSM*, 18, 116–126.

- Pietri, A., Leni, G. , Mulazzi, A. & Bertuzzi, T. (2022). Ochratoxin A and sterigmatocystin in long-ripened grana cheese: occurrence, wheel rind contamination and effectiveness of cleaning techniques on grated products. *Toxins*, 14, 306. <https://doi.org/10.3390/toxins14050306>
- Perin, L. M., Savo Sardaro, M. L., Nero, L. A., Neviani, E. & Gatti, M. (2017). Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. *Food Microbiology*, 65, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.005>
- Pineda, A. P. A., Campos, G. Z., Pimentel-Filho, N. J., Franco, B. D. G. M & Pinto, U. M. (2021). Brazilian Artisanal Cheeses: Diversity, Microbiological Safety, and Challenges for the Sector. *Frontiers in Microbiology*, 12, 666922. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.666922>
- Pinto, M. S. (2004). Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do Queijo Minas Artesanal do Serro. Viçosa: UFV. 2004. 133 p. Dissertação de mestrado.
- Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (2022). Fungi and Food Spoilage. 4th ed; Springer New York, USA; 2022, 645pp. doi: 10.1007/978-3-030-85640-3.
- Prado, G., Oliveira, M. S., Pereira, M. L., Abrantes, F. M., Santos, L. G. & Veloso, T. (2000). Aflatoxin M1 in samples of "minas" cheese commercialized in the city of Belo Horizonte - Minas Gerais/Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20, 398-400.
- Quéro, L., Girard, V., Pawtowski, A. Tréguer, S., Weill, A., Arend, S., Cellière, B., Polsinelli, S., Monnin, V., van Belkum, A., Vasseur, V., Nodet, P. & Mounier, J. (2019). Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi." *Food microbiology*, 81, 76-88. doi:10.1016/j.fm.2018.05.001
- Rocha, A. M. P. (2004). Controle de fungos durante a maturação de queijo Minas Padrão. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Retrieved in 2024, 8th November, from <http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/5637/ANDREIAROCHA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Resende, M. F. S. (2010). Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas. 72p. Dissertação (Mestrado em ciência animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Rolland, N., Girard, V., Monnin, V., Arend, S., Perrin, G., Ballan, D., Beau, R., Collin, V., D’Arbaumont, M., Weill, A., Deniel, F., Tréguer, S., Pawtowski, A., Jany, J. L., & Mounier, J. (2024). Identification of food spoilage fungi using MALDI-TOF MS: spectral database development and application to species complex. *Journal of Fungi*, 10, 456. doi:10.3390/jof10070456

- Santos, F. A. A., Lamounier, M. A., & Teixeira, N. C. (2017). Production of Minas artisanal cheese on Serro. *Revista Pensar Gastronomia*, 3, 2.
- Saraiva, C. B., Magalhães, F. A. R., Moreira, V. E. & Barros, S. O. (2012). Aspectos ambientais da produção do queijo Minas artesanal. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 67, 41-47 <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120063>
- SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). O mercado de queijos finos - Polo Sebrae Agro. 2023. Retrieved in 2024, 5th November, from <https://polosebraeagro.sebrae.com.br/o-mercado-de-queijos-finos/>. Acesso em: 5 nov. 2024.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Schmidt-Heydt, M., Dominic Stoll, E. G. & Geisen, R. (2012). The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiology*, 29, 233-241. doi: 10.1016/j.fm.2011.08.003
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. & Fungal Barcoding Consortium & Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6241-6. doi:10.1073/pnas.1117018109.
- Simon, P. (1996). Ochratoxin and kidney disease in the human. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 15, 239-249. <https://doi.org/10.3109/15569549609016446>
- De 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>
- Taniwaki, M. H. & Van Dender, A. G. F. (1992). Occurrence of toxigenic molds in Brazilian cheese. *Journal of Food Protection*, 55, 187-191. doi: 10.4315/0362-028X-55.3.187
- Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Teixeira, A.A. & Iamanaka, B.T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 173-179, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00310-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00310-0)
- Taniwaki, M.H., Silva, J. J. & Niessen, L. (2023). The use of big data in the field of food mycology and mycotoxins. In: *Harnessing Big Data in Food Safety*. J Farber, R Dara, J Ronholm (eds). New York: Springer Cham. Series ISSN 2629-1010
- Tavakoli, H.R., Riazipour, M., Kamkar, A., Shaldehi, H.R. & Nejad, A.S.M. (2012). Occurrence of aflatoxin M1 in white cheese samples from Tehran, Iran. *Food Control*, 23, 293-295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.024>

- USDA (United States Department of Agriculture). (2021). Dairy and Products Annual. Report Number: BR2021-0042. Retrieved in 2024, 5th November, from https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Dairy%20and%20Products%20Annual_Brasilia_Brazil_10-15-2021. Van Egmond, H. P. & Paulsch, W.E. (1986). Determination of mycotoxins. *Pure and Applied Chemistry*, 58, 315-326. <http://dx.doi.org/10.1351/pac198658020315>
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Zacarchenco, P.B., Trento, F.K.H.S., Spadoti, L.M., Gallina, D.A. & Silva-Alves, A.T. (2011). Bolores e leveduras em queijos. *Revista Leite e Derivados*, 129, 92-99.
- Zambonin, C.G., Monaci, L. & Aresta, A. (2001). Determination of cyclopiazonic acid in cheese samples using solid-phase microextraction and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 75, 249–54. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00218-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00218-7)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem das cepas

Um total de 184 cepas sendo 92 de *Aspergillus* e 92 de *Penicillium*, isoladas de amostras de queijos artesanais de 6 produtores de Minas Gerais, região da Canastra, 1 produtor de São Paulo, região de Amparo e comércios de Minas Gerais e São Paulo, foram selecionadas para este estudo, como mostra a **Tabela 1**. Estas cepas estavam armazenadas em sílica na Coleção de Cultura de Fungos do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital).

Tabela 1. Número de isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* isolados de queijos sendo 6 produtores de Minas Gerais (produtor 1 a 6), 1 produtor de São Paulo (produtor 7) e comércios de Minas Gerais e São Paulo.

Origem	<i>Aspergillus</i>			<i>Penicillium</i>		
	Queijo	Raspagem	Ar	Queijo	Raspagem	Ar
Produtor 1	23	1	5	0	0	6
Produtor 2	34	0	5	23	0	10
Produtor 3	1	1	0	3	2	2
Produtor 4	0	3	0	0	0	1
Produtor 5	04	0	1	8	2	5
Produtor 6	10	3	2	7	7	10
Produtor 7	1	1	0	2	5	3
Comércio	1	0	0	0	0	0
Total	70	9	13	43	16	33
Total geral	184					

4.2 Extração do DNA genômico

As cepas selecionadas foram reativadas em meio ágar extrato de levedura Czapek (CYA, PITT e HOCKING, 2022) e purificadas pela técnica de cultura monospórica no meio CYA. Em seguida foram cultivadas em meio líquido de extrato de levedura (YES) a 25 °C por 3 a 5 dias até a formação de uma película micelial. As películas foram retiradas com auxílio de uma alça estéril e transferidas para tubos contendo uma solução tampão, com água Mili-Q, tris HCl 1M, SDS 10%, NaCl 5M e EDTA 0,5M. Foram adicionadas pérolas de vidro nos tubos e levados ao vórtex para maceração da parede celular fúngica. Em seguida os tubos foram colocados no banho a 70°C, e

retornado ao vórtex para continuar a maceração. Esse material foi utilizado para extração do DNA genômico através do kit Gel DNA Purification (Mebep Bioscience, China) conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

A quantificação do DNA foi inicialmente realizada pelo método espectrofotométrico, em NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific), e posteriormente, a quantidade de DNA foi confirmada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A quantificação foi feita através da comparação da fluorescência sob luz UV entre as bandas de DNA obtidas e uma amostra de DNA de concentração já conhecida (**Figura 1**). Após a quantificação, as amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

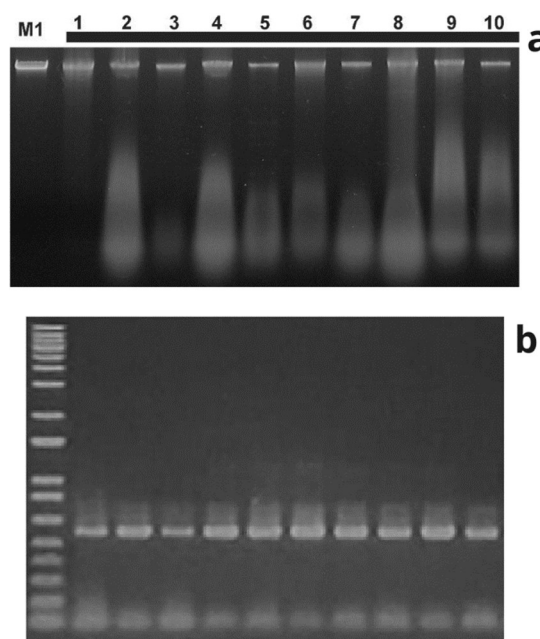


Figura 1. (a) Quantificação do DNA genômico de alguns representantes de *Penicillium* spp.; M1= Marcador Lambda DNA (200 ng). 1-10=cepas de *Penicillium* spp. isolados de queijo. (b) Eletroforese da amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) locus *BenA*. Marcador 1kb Plus DNA (Thermo Scientific).

4.3 Identificação molecular dos isolados

Para a identificação dos isolados dos gêneros *Aspergillus* foi realizada a amplificação e sequenciamento de parte do gene da calmodulina (*CaM*) utilizando os primers CF1 e CF4 (5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG 3'), descritos por PETERSON *et al.* (2005). Para a identificação dos isolados dos gêneros *Penicillium* foi realizada a amplificação e sequenciamento de parte do gene da beta-tubulina (*BenA*) utilizando os primers BT2A e BT2B (GLASS e DONALDSON,1995).

As amplificações foram realizadas através de reação de polimerase em cadeia (PCR) sob as seguintes condições:

- 1 X tampão de PCR (Invitrogen Life Technologies, USA),

- 0,2 mM de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA),
- 0,4 μ M de cada um dos primers (Exxtend, Brasil),
- 2,0 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen Life Technologies, USA),
- 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA)
- 20 ng de DNA genômico.

As reações resultantes foram submetidas a um termociclador VERITI® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), programado para um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos compostos por 45 segundos de desnaturação a 94 °C, 45 segundos a 55 °C para o anelamento dos primers e 60 segundos a 72 °C para extensão.

Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. O DNA Ladder 1 kb Plus® (Invitrogen Life Technologies, USA) foi utilizado como padrão de tamanho para os produtos da PCR (**Figura 2b**).

Os produtos da amplificação foram purificados utilizando ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup reagent (Thermo Fisher Scientific, EUA) conforme protocolo do fabricante. Os fragmentos foram submetidos ao sequenciamento direto, utilizando o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) e submetidos ao aparelho SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

As sequências obtidas foram comparadas através de alinhamento local utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) contra os bancos de dados do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Adicionalmente, árvores filogenéticas de máxima verossimilhança foram construídas no programa MEGA 11 (KUMAR *et al.*, 2019).

4.4 Manutenção das cepas por Sílica Gel

A manutenção das cepas utilizadas foi feita pela metodologia de sílica, descrita por SMITH e ONIONS (1983). Promoveu-se o crescimento do fungo e a suspensão dos esporos em agente protetor constituído de 5% de leite em pó estéril. Em seguida, a suspensão foi distribuída em tubos com sílica gel estéreis e congelados e agitada para penetração do líquido. A secagem foi realizada na estufa a 30°C por um período de 30 dias com agitações constantes. Após este período os tubos foram armazenados em refrigeração e longe da luz, para uso posterior.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o sequenciamento os isolados de *Aspergillus* e *Penicillium*, foram construídas árvores filogenéticas através do método de máxima verossimilhança. Na bioinformática o termo “verossimilhança” é usado para indicar o “mais provável com o real”, assim, o método de construção de árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood - ML*) é um diagrama que representa as relações evolutivas mais prováveis a partir das sequências analisadas (VIANA, 2007; BUSO, 2005; CORDEIRO, 2010).

Com base nos dados do gene da calmodulina (*CaM*), através da ML foram encontradas três séries (*Versicolores*, *Rubri* e *Circumdati*) nos isolados do gênero *Aspergillus*, como mostra a **Figura 2**. Na série *Versicolores* (**Figura 2a**), foram encontradas as espécies *Aspergillus tennesseensis*, *A. creber*, *A. venatus*, *A. hongkongensis*, *A. tabacinus*, *A. protuberus*, *A. amoenus* e *A. sydowii*. A espécie mais encontrada foi *A. tennesseensis* com 28 isolados, desses, 22 foram isolados das amostras de queijos artesanais. Na seção *Circumdati* (**Figura 2b**), foram encontradas 18 espécies de *A. westerdijkiae* e 1 espécie de *A. steynii*, a maioria desses isolados foram procedentes das amostras de queijos artesanais e de ar. Na seção *Rubri* (**Figura 2c**), houve apenas 2 isolados da espécie *A. pseudoglaucus*, ambos provenientes das amostras de queijos artesanais.

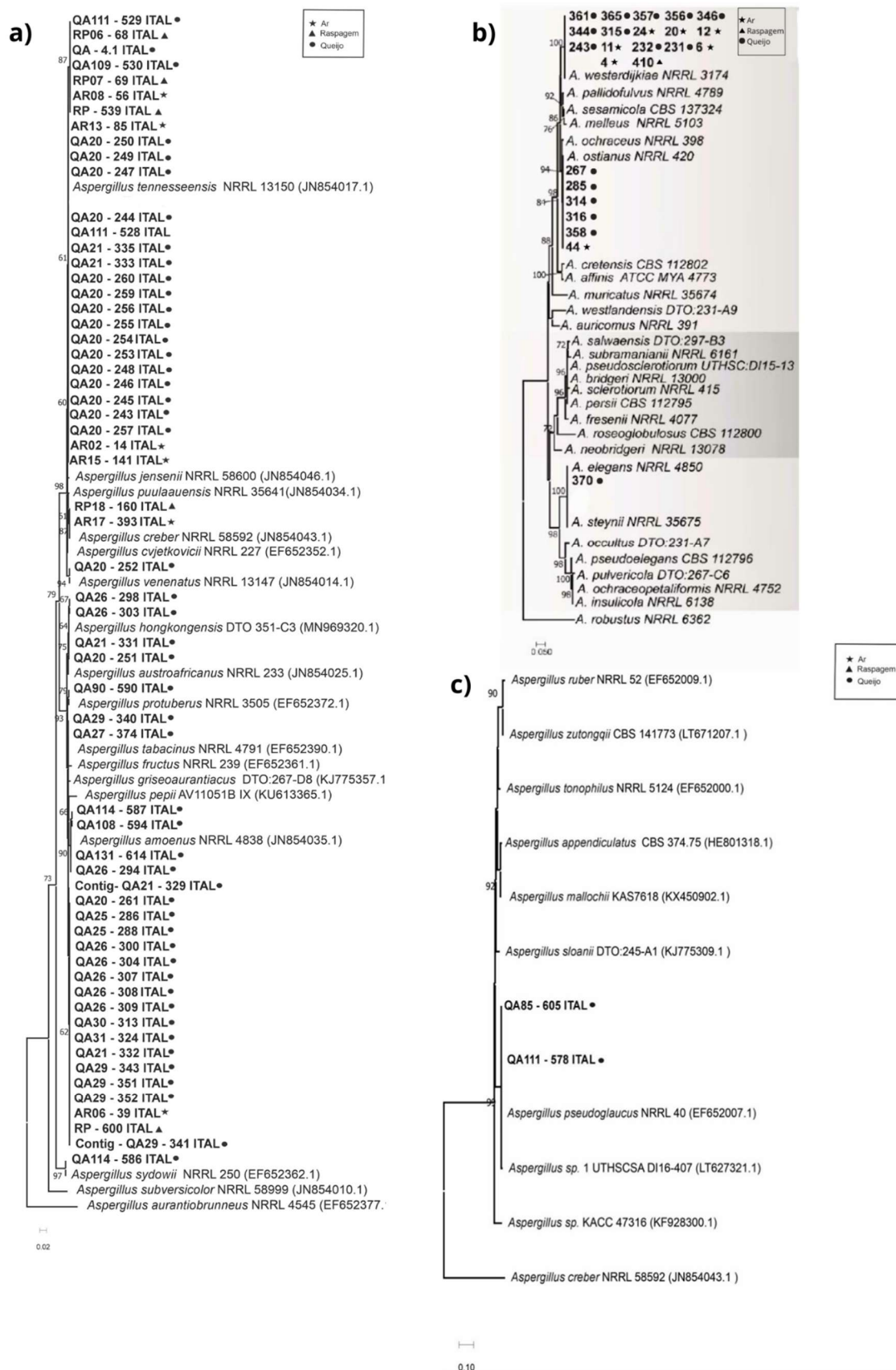


Figura 2. a) Árvore de Máxima Verossimilhança de *Aspergillus* série *Versicolores* com base em dados de *CaM*. **b)** Árvore de Máxima Verossimilhança de *Aspergillus* section *Circumdati* com base em dados de *CaM*. **c)** Árvore de Máxima Verossimilhança de *Aspergillus* section *Rubri* com base em dados de *CaM*.

Com base nos dados de *BenA*, o gênero *Penicillium* apresentou árvores filogenéticas separadas em uma multisérie, e mais quatro séries. A **Figura 3**, mostra a árvore de máxima verossimilhança da multisérie de *Penicillium* (*Turbata*, *Olsoniorum*, *Simplicíssima*, *Idahoensia*, *Adametziorum* e *Herqueorum*). Nestas séries foram encontradas as espécies *P. herquei*, *P. brocae*, *P. infrapurpureum*, *P. wotroi*, *P. olsonii* e *P. madriti*. As origens destas espécies são indicadas conforme as siglas: queijos artesanais (QA), ar (AR) e raspagens (RP) ou representados por formas geométricas especificadas nas legendas das imagens. A espécie mais frequente foi *P. olsonii* (6), seguida de *P. madriti* (4), as demais espécies apresentaram apenas 1 isolado.

A **Figura 4** apresenta as espécies do gênero *Penicillium* da série *Camembertiorum*, *Brevicompecta*, *Citrina* e *Copticolorum*. A série *Camembertiorum* (**Figura 4a**) está representada pelas espécies *P. biforme*, *P. caseifulvum*, *P. solitum* e *P. crustosum*. A espécie mais comum nessa série foi *P. biforme*, com 29 isolados, sendo 22 originários das amostras de queijos artesanais.

Na série *Brevicompecta* (**Figura 4b**) foram encontrados 8 isolados *P. brevicompactum* e 1 de *P. kongii*, sendo todos provenientes das amostras do ar. Na série *Citrina* (**Figura 4c**) as seguintes espécies foram encontradas, *P. citrinum*, *P. sizovae*, *P. steckii*, e *P. cerradense*. A espécie mais comum foi *P. citrinum* com 7 isolados, nas amostras do ar foram isoladas 4 cepas desta espécie. A árvore filogenética da série *Copticolorum* é representada pela **Figura 4d**, as espécies encontradas foram *P. copticola* e *P. terrigeneum*, sendo a primeira a mais recorrente, com 11 isolados, e desses, 9 foram coletados de amostras dos queijos artesanais (QA).

Não foram montadas árvores filogenéticas para as demais cepas, mas todas as 184 foram identificadas molecularmente conforme mostra a **Tabela 2**. Houve uma grande diversidade das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas das amostras dos queijos, do ar e da raspagem.

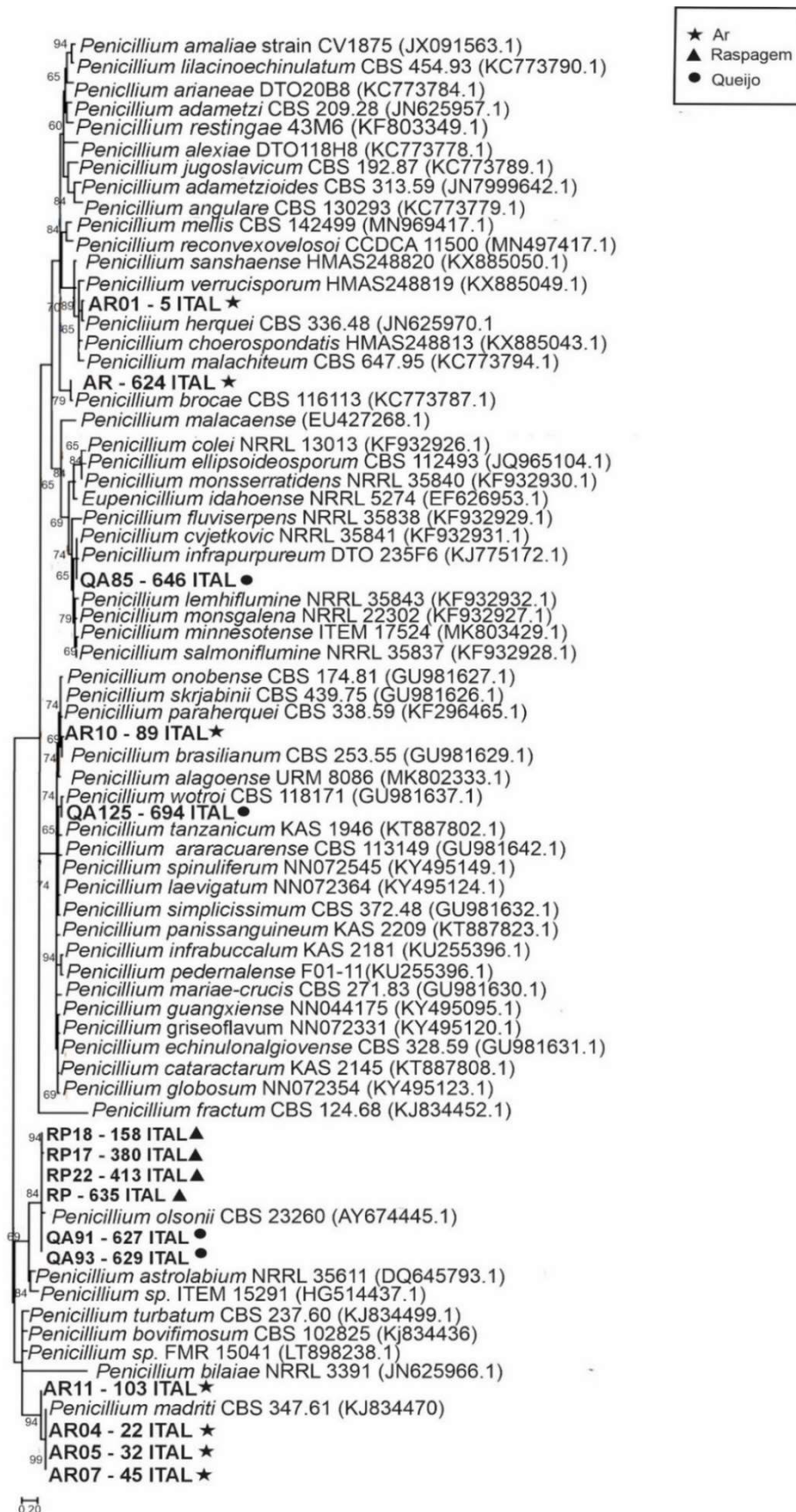


Figura 3 - Árvore de Máxima Verossimilhança de *Penicillium Multiséries* (Ser. *Turbata*, *Olsoniorum*, *Simplicissima*, *Idahoensia*, *Adametziorum* e *Herqueorum*) com base em dados de *BenA*.

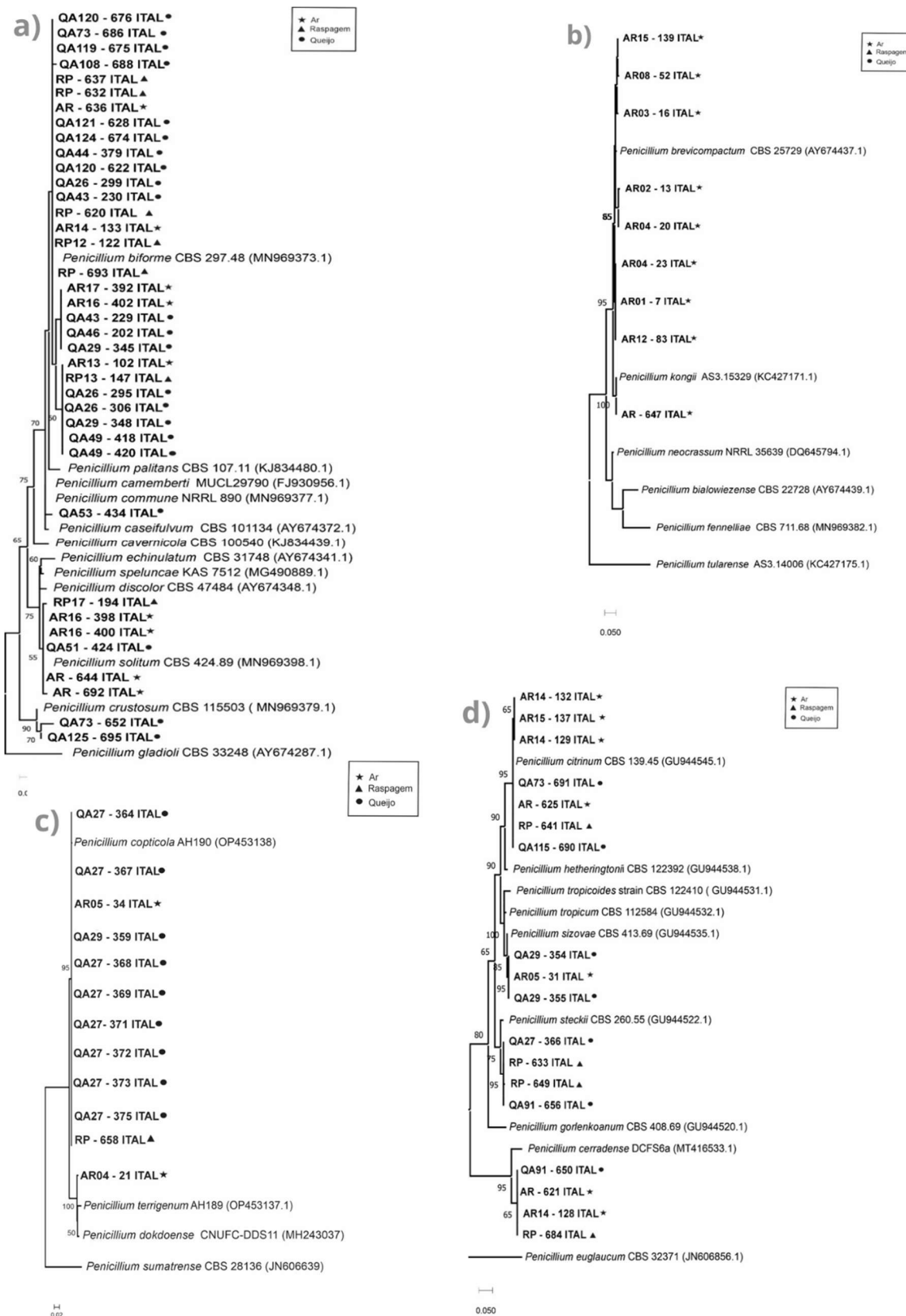


Figura 4 - a) Árvore de Máxima Verossimilhança de *Penicillium* série *Camembertiorum* com base em dados de *BenA*. **b)** Árvore de Máxima Verossimilhança de *Penicillium* série *Brevicompacta* com base em dados de *BenA*. **c)** Árvore de Máxima Verossimilhança de *Penicillium* série *Copticularum* com base em dados de *BenA*. **d)** Árvore de Máxima Verossimilhança de *Penicillium* série *Citrina* com base em dados de *BenA*.

Tabela 2. Diversidade das espécies fúngicas identificadas molecularmente

Espécies	Quantidade dos isolados	Porcentagem dentre os gêneros (%)
<i>A. amoenus</i>	22	24
<i>A. cibarius</i>	1	1,1
<i>A. creber</i>	2	2,2
<i>A. steynii</i>	1	1,1
<i>A. flavus</i>	1	1,1
<i>A. hongkongensis</i>	4	4,3
<i>A. luchuensis</i>	1	2,2
<i>A. ostianus</i>	6	6,5
<i>A. protuberus</i>	1	1,1
<i>A. pseudoglaucus</i>	2	2,2
<i>A. sydowii</i>	1	1,1
<i>A. tabacinus</i>	2	2,2
<i>A. taichugensis</i>	1	1,2
<i>A. tennesseensis</i>	27	30
<i>A. venatus</i>	1	1,1
<i>A. welwitschiae</i>	1	1,1
<i>A. westerdijkae</i>	18	20
Total de <i>Aspergillus</i>	92	
<i>P. biforme</i>	28	30
<i>P. brasilianum</i>	1	1,1
<i>P. brevicompactum</i>	8	8,7
<i>P. brocae</i>	1	1,1
<i>P. caseifulvum</i>	1	1,1
<i>P. cerradense</i>	4	4,3
<i>P. citrinum</i>	7	7,7
<i>P. copticola</i>	11	12
<i>P. crustosum</i>	2	2,2
<i>P. herquei</i>	1	1,1
<i>P. infrapurpureum</i>	1	1,1
<i>P. kongii</i>	1	1,1
<i>P. madriti</i>	4	4,3
<i>P. mallochii</i>	1	1,2
<i>P. olsonii</i>	6	6,5
<i>P. sizovae</i>	3	3,3
<i>P. solitum</i>	6	6,5
<i>P. steckii</i>	4	4,3
<i>P. terrigenum</i>	1	1,1
<i>P. wotroi</i>	1	1,2
Total de <i>Penicillium</i>	92	
Total de fungos	184	

Tabela 3 – Comparação das identificações dos diferentes locais de coleta

Local/ Produtor	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Comércio
AR		<i>A. amoenus</i> <i>A. ostianus</i> <i>A. tennesseensis</i>						
	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. westerdijkiae</i>				<i>A. creber</i>	<i>P. solitum</i>	
	<i>P. brevicompactum</i>	<i>P. brevicompactum</i>	<i>P. brevicompactum</i>		<i>A.</i>	<i>P. solitum</i>	<i>P. biforme</i>	
	<i>P. cerradense</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>P. madriti</i>	<i>P. brasilianum</i>	<i>tennesseensis</i>	<i>P. biforme</i>	<i>P. brocae</i>	
	<i>P. herquei</i>	<i>P. copticola</i>			<i>P. biforme</i>	<i>P. brevicompactum</i>	<i>P. cerradense</i>	
	<i>P. kongii</i>	<i>P. madriti</i>				<i>P. cerradense</i>	<i>P. citrinum</i>	
		<i>P. olsonii</i>				<i>P. citrinum</i>		
		<i>P. sizovae</i>						
		<i>P. terrigenum</i>						
RP	<i>A. flavus</i>	-	<i>A. welschitae</i> <i>P. biforme</i> <i>P. steckii</i>	<i>A. amoenus</i> <i>A.</i> <i>tennesseensis</i>	<i>P. biforme</i>	<i>A. creber</i> <i>P. solitum</i> <i>A. westerdijkiae</i> <i>P. biforme</i> <i>P. olsonii</i> <i>P. steckii</i>	<i>A. luchuensis</i> <i>P. biforme</i> <i>P. cerradense</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. copticola</i> <i>P. olsonii</i>	-
QA		<i>A. amoenus</i> <i>A. hongkongensis</i> <i>A. ostianus</i> <i>A. tabacinus</i> <i>A. taichugensis</i> <i>A. protuberus</i>						
	<i>A. amoenus</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>	<i>A. westerdijkiae</i>			<i>A. amoenus</i> <i>A. caseifulvum</i> <i>A. cibarius</i>	<i>A. amoenus</i>	
	<i>A. hongkongensis</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>P. biforme</i>		<i>P. biforme</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>	<i>A.</i>	
	<i>A. venatus</i>	<i>P. biforme</i>	<i>P. citrinum</i>	-	<i>P. citrinum</i>	<i>P. solitum</i>	<i>pseudoglaucus</i>	<i>A. amoenus</i>
	<i>A. tennesseensis</i>	<i>P. cerradense</i>	<i>P. crustosum</i>			<i>A. sidowii</i>	<i>P. crustosum</i>	
		<i>P. copticola</i>				<i>A. tennesseensis</i>	<i>P. wotroi</i>	
		<i>P. infrapurpureum</i>				<i>A. westerdijkiae</i>		
		<i>P. mallochii</i>				<i>P. biforme</i>		
		<i>P. olsonii</i>						
		<i>P. sizovae</i>						
		<i>P. steckii</i>						

As espécies mais frequentes entre as espécies de *Penicillium* foram: *Penicillium biforme* (30%), *P. copticola* (12%), *P. brevicompactum* (9%). Dentre as espécies de *Aspergillus* foram: *A. tennesseensis* (30%), *A. amoenus* (24%) e *A. westerdijkiae* (20%). A partir desses resultados, foi possível observar a variação na diversidade de espécies nas amostras de queijo artesanal, ar e raspagem dos diferentes produtores coletados de Minas Gerais e São Paulo.

Após a identificação molecular dos isolados foi também possível comparar as diferenças e semelhanças entre os produtores e a origem das amostras. No Produtor 1 foram encontradas 10 espécies diferentes, nos três locais de coleta, *A. westerdijkiae*, *P. brevicompactum*, *P. cerradense*, *P. herquei*, *P. kongii*, nas amostras do ar, *A. flavus*, nas amostras de raspagem e *A. amoenus*, *A. hongkongensis*, *A. venatus* e *A. tennesseensis*, nas amostras de queijos. Com isso, foi possível

observar a existência de potenciais espécies produtoras de micotoxinas, como *Aspergillus westerdijkiae*, produtor da ocratoxina A, *A. flavus*, produtor de aflatoxinas e *A. tennesseensis* e *A. amoenus* produtores da esterigmatocistina.

No Produtor 2 obteve-se 21 espécies diferentes nos três locais coletados, *A. amoenus*, *A. hongkongensis*, *A. ostianus*, *A. tabacinus*, *A. taichugensis*, *A. tennesseensis*, *A. protuberus*, *A. pseudoglaucus*, *A. westerdijkiae*, *P. biforme*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. cerradense*, *P. copticola*, *P. infrapurpureum*, *P. madriti*, *P. mallochii*, *P. olsonii*, *P. sizovae*, *P. steckii* e *P. terrigenum*. Além das espécies com potencial toxigênico descritas anteriormente, foram encontradas as espécies *A. ostianus* potencial produtora de ocratoxina A, e *P. citrinum* potencial produtora de citrinina. No produtor 2 as espécies *A. amoenus*, *A. ostianus*, *A. westerdijkiae*, *P. biforme*, *P. copticola*, *P. olsonii*, e *P. sizovae* estavam presentes tanto no ar quanto nos queijos. Provavelmente os esporos presentes no ar da câmara de maturação se espalharam e contaminaram a superfície do queijo.

No Produtor 3, foram encontradas 7 espécies distintas, *P. brevicompactum*, *P. madriti*, *A. welschitae*, *P. biforme*, *P. steckii*, *A. westerdijkiae*, *P. citrinum*, *P. crustosum*. Evidenciando o *P. biforme* que foi comum tanto nas amostras de queijos como nas de raspagem. As espécies potencialmente produtoras de micotoxinas foram *A. welschitae* e *A. westerdijkiae*, produtores de ocratoxina A, *P. citrinum* produtor da citrinina além de *P. crustosum* produtor de penitrem A e roquefortina C.

No Produtor 4, foram encontradas as espécies de *P. brasilianum*, *A. amoenus* e *A. tennesseensis*, sendo as duas últimas potenciais produtoras de esterigmatocistina. Enquanto que no produtor 5, isolou-se *A. tennesseensis*, *P. biforme*, *P. citrinum*. A espécie de *P. biforme* foi comum nos 3 locais de coleta, ar, raspagens e queijos.

No Produtor 6, *A. creber*, *A. solitum*, *P. biforme*, *P. brevicompactum*, *P. cerradense*, *P. citrinum*, *P. olsonii*, *P. stecki*, *A. amoenus*, *A. caseifulvum*, *A. cibarius*, *A. pseudoglaucus*, *A. tennesseensis*, *A. westerdijkiae*. *A. creber*, foram isolados tanto nas amostras do ar quanto da raspagem. *A. solitum* e *P. biforme* foram isolados nos 3 locais de coleta, e *A. westerdijkiae*, tanto na raspagem quanto nos queijos.

No Produtor 7, *A. amoenus*, *A. pseudoglaucus*, *P. crustosum*, *P. wotroi*, *A. luchuensis*, *P. cerradense*, *P. citrinum*, *P. copticola*, *P. olsonii*, *A. solitum*, *P. biforme*, *P. brocae*. E *P. cerradense*, *P. biforme*, *P. citrinum* foram isolados das amostras do ar e das raspagens. No comércio *A. amoenus* estava presente na amostra de queijo.

Espécies do gênero *Aspergillus*, produtoras de micotoxinas como *A. versicolor*, *A. westerdijkiae* e *A. nomius*, já foram reportadas em amostras de queijo (HYMERY *et al.*, 2014, ANELLI *et al.*, 2019). Estas espécies além de causar perdas econômicas devido às alterações

indesejáveis, como má aparência, descoloração e desenvolvimento de sabores indesejáveis são potenciais produtores de micotoxinas (MARCELLINO e BENSON, 2014).

Após uma extensa revisão de possíveis micotoxinas e fungos toxigênicos que podem ser encontrados em queijos de várias partes do mundo, HIMERY *et al.* (2014) concluíram que as micotoxinas de maior risco são a aflatoxina M1 e a ocratoxina A devido à sua maior estabilidade e toxicidade. Recentemente, MARCELÃO *et al.* (2024) reportaram a presença de *A. westerdijkiae*, *A. steynii* e *A. ostianus* produtores de ocratoxina A e a presença desta toxina em várias amostras de queijos artesanais brasileiros, mostrando que a ocratoxina A é um problema real nestes tipos de queijos.

A. westerdijkiae produtor de ocratoxina A já foi encontrado em queijos maturados nas cavernas no Sul da Itália, esporos desta espécie estavam presentes nas paredes das cavernas fazendo parte da microbiota (MONTAGNA *et al.*, 2004).

No presente trabalho foi encontrada uma grande diversidade de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* nas amostras do ar, das raspagens das prateleiras e dos queijos. Da mesma forma, CÉSAR (2019), investigando os fungos que ocorrem nas câmaras de maturação das queijarias da Serra da Canastra, observou a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* que foram provenientes das amostras das prateleiras e do ar.

ANELLI *et al.* (2019), estudando os fungos que colonizam espontaneamente os queijos artesanais maturados em cavernas, observaram que as espécies *Aspergillus westerdijkiae* e *Penicillium biforme* foram dominantes nas cascas de queijos maturados em cavernas. Além disso, outras espécies toxigênicas foram isoladas, entre elas, *A. westerdijkiae* e *A. steynii* chamaram a atenção por serem produtoras de ocratoxina A (OTA). Além disso, ANELLI *et al.* (2019), encontraram as espécies de *P. jugoslavicum*, *P. salamii*, *P. solitum*, *P. gravinicasei*, *A. pseudoglaucus* e *A. tritici*.

Ainda, sobre o gênero *Penicillium*, a espécie mais difundida foi *P. biforme*, fortemente associado ao queijo e ambientes relacionados. Existem relatos de outras espécies isoladas de amostras de queijos como *P. paneum*, conhecida como produtora de patulina, *P. roqueforti*, *P. chrysogenum* e *P. crustosum* produtores de roquefortina C (FRISVAD *et al.*, 2004; FRISVAD *et al.*, 2006)

No presente estudo foi possível observar uma grande similaridade das cepas presentes nas amostras do ar, raspagem e queijos demonstrando que existe uma contaminação direta nos locais onde os queijos são maturados. As condições de higiene do ambiente podem impactar diretamente na microbiota das cascas dos queijos, principalmente, durante a maturação, quando

os queijos recém produzidos entram em contato direto com as superfícies onde os queijos mais antigos estão sendo armazenados por dias ou até meses (MARTIN e COTTER, 2023).

Apesar do aumento do conhecimento sobre os fatores que influenciam o desenvolvimento dos fungos, existem fatores indesejáveis durante o processo de maturação do queijo, que tem sido uma das principais preocupações dos produtores de queijo artesanal.

Um estudo feito nos Estados Unidos por BIANGO-DANIELS e WOLFE (2021), teve como objetivo classificar as preocupações dos produtores de queijos artesanais em relação à: qualidade dos queijos curados produzidos; documentar os problemas comuns encontrados nas cascas dos queijos; e os efeitos negativos associados. Além disso identificar os recursos e ferramentas utilizados e explorar quais outros recursos seriam considerados benéficos aos produtores. Neste estudo, 71% dos produtores entrevistados consideraram o aumento dos bolores superficiais indesejados, 54% relataram problemas como cores ou pigmentos indesejados nas cascas, e 18% relataram que estavam extremamente preocupados com problemas de qualidade e deterioração, mencionando que seus padrões de qualidade frequentemente não são atendidos. Foi mostrado que os 73,8% dos entrevistados utilizavam artigos científicos relacionados à deterioração e qualidade. Mais da metade usaram treinamento presencial (68,8%), fóruns online para produtores de queijo (57,4%), recursos de diagnóstico para identificar microrganismos deteriorantes (57,4%) e consultores (50,8%) para gerenciar a qualidade e a deterioração do queijo. Assim, quase todos os entrevistados (95%) concordaram que a melhoria da qualidade diminuiria o desperdício, aumentaria os lucros e melhoraria a produção. Esses também afirmaram que obteriam muitos benefícios com acesso a mais recursos adicionais online relacionados a questões de qualidade e fóruns digitais para discutir dúvidas com especialistas e colegas quando surgirem problemas (BIANGO-DANIELS e WOLFE, 2021).

Alguns produtores com a finalidade de resolver o problema do crescimento fúngico, passaram a vê-lo como uma vantagem, produzindo queijos de casca florida sem culturas secundárias, contando apenas com os fungos autóctones presentes na superfície do queijo. Nesse contexto, os fungos, antes vistos como responsáveis pela baixa qualidade do queijo, começaram a ocupar uma importante posição na qualidade do produto e abrindo um mercado de queijos de casca florida. No entanto, é importante ressaltar que mais estudos sobre a micobiota do queijo, e os fungos associados à produção de micotoxinas e aos fatores ambientais ligados à sua produção nos queijos devem ser realizados para avaliar o risco (MARTIN e COTTER, 2023).

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que o modo de produção, os locais de armazenamento e as condições geográficas podem interferir na micobiota encontrada nas câmaras de maturação. Esses fatores acabam por gerar uma grande diversidade de espécies nos queijos artesanais, nas prateleiras de armazenamento e no ar das câmaras. Algumas espécies podem ser desejáveis para dar um sabor especial ao queijo artesanal, porém algumas espécies encontradas neste trabalho são indesejáveis por apresentarem um potencial toxigênico.

Desse modo, o presente projeto poderá auxiliar os órgãos governamentais a tomar medidas de prevenção quanto a contaminações de fungos indesejáveis e produtores de micotoxinas, e preparar futuras regulamentações relacionadas aos queijos artesanais.

7. REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- ANDRADE, R. P.; MELO, C. N.; GENISHEVA, Z.; SCWAN, R. F.; DUARTE W. F. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, v. 91, p. 72-79, 2017
- ANELLI, P.; HAIDUKOWSKI, M.; EPIFANI, F.; CIMMARUSTI, M. T.; MORETTI, A.; LOGRIECO, A.; SUSCA, A. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. **Food Microbiology**, v. 78, p. 62-72, 2019. Disponível em : <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.014>.
- ARAGÃO, M. O. P. **Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em Queijo Minas Artesanal das microrregiões do Serro e da Serra da Canastra**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, 2018, 118pp.
- BIANGO-DANIELS, M. N.; WOLFE, B. E. American artisan cheese quality and spoilage: A survey of cheesemakers' concerns and needs. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 5, p. 6283-6294, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19345>.
- BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; PENIDO, F. C. L.; ROSA, C. A. Traditional Cheese Produced in Brazil: Characterisation, Production, Technologies and Health Implications. In: Perkins E, editor. **Food Microbiology Fundamentals, Challenges and Health Implications**. New York: Nova Science Publishers Inc. pp. 161–189, 2016.
- BUSO, G. S. C. Marcadores Moleculares e Análises Filogenéticas. EMBRAPA. Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, Distrito Federal. 2005. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/187120/1/doc137.pdf>
- CARDOSO, V. M.; BORELLI, B. M.; LARA, C. A.; SOARES, M. A.; PATARO, C.; BODEVAN, E. C.; ROSA, C. A. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69, p. 331-340, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.040>
- CASTILHO, A. C. B.; STAFUSSA, A. P.; RODRIGUES, L. M.; RESSUTTE, J. B.; SANTOS POZZA, M. S.; MADRONA, G. S. Queijos artesanais do Paraná: caracterização de sua composição centesimal. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 21543-21567, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv5n10-306>

- CÉSAR, I. C. R. **Caracterização de fungos filamentosos do Queijo Minas Artesanal da região da Canastra**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2019.
- CORDEIRO, J. S. **Caracterização Molecular e Análise Filogenética dos Vírus Dengue Circulantes na Cidade de Boa Vista**, Roraima, Brasil. Dissertação de Mestrado INPA. Manaus-AM, 2010.
- FERRAZ, K. S.; GONÇALVES, S. M.; VALENTINI, H. S.; ROCHA, B. A. R.; MONTEIRO, L. J. M.; ALMEIDA, A. A. P. Avaliação de parâmetros bromatológicos em queijo tipo Canastra produzido artesanalmente/ Evaluation of bromatological parameters in Canastra cheese produced craftly. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 61444-61460, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n6-492>
- FRISVAD JC, SMEDSGAARD J, LARSEN TO, SAMSON RA, ROBERT A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, V. 49, P. 201–41, 2004.
- FRISVAD JC, THRANE U, SAMSON RA, PITT JL. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: HOCKING AD, PITT JI, SAMSON RA, THRANE U, editors. **Advances in Food Mycology. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 571, p. 3–31, 2006.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323-1330, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330>.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-21, 2003a. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- HEBERT, P.D.N., RATNASINGHAM, S., DEWAARD, J.R. Barcode animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London B**. v. 270, Suppl 1, pp. S96-99, 2003b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- HYMERY, N.; VASSEUR, V.; COTON, M.; MOUNIER, J.; JANY, J. L.; BARBIER, G.; COTON, E. Filamentous fungi and mycotoxins in Cheese: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety**, v. 13, p. 437-456, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>.
- KUMAR, V.; SONI, R.; JAIN, L.; DASH, B.; GOEL, R. Endophytic Fungi: Recent Advances in Identification and Explorations, In: Singh, B. (eds) **Advances in Endophytic Fungal**

- Research. Fungal Biology.** Springer, Cham, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-03589-1_13
- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, n. 6, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000600024>
- MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA JÚNIOR, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0101-20612004000400006>
- MARCELÃO, C. V. P.; SOUZA, M. C.; SILVA, J. J.; COUTO, F. A.; LACORTE, G. A.; PINTO, U. M.; MAFFEI, J. T.; ZACARCHENCO, P. B.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H. Unveiling ochratoxin A and ochratoxigenic fungi in Brazilian artisanal Cheeses: Insights from production to consumption. **Food Research International**, v. 183, 2024. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114214>
- MARCELLINO, N.; BENSON, D. R. The good, the bad, and the ugly: tales of mold ripened cheese. **American Society of Microbiology**, v. 1, p. 95-131, 2014.
- MARTIN, J. G. P.; COTTER, P. D. Filamentous fungi in artisanal cheeses: A problem to be avoided or a market opportunity? **Heliyon**, v.31, p. e15110, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15110>
- Montagna, M.T., Santacroce, M.P., Spilotros, G., Napoli, C., Minervini, F., Papa, A., Dragoni, I. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in Southern Italy. **Mycopathologia** v.158, p. 245–249, 2004.
- MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; DELBES-PAUS, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N.; BERTHIER, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 136 – 154, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- PETERSON, S.W.; VEGA, F. E.; POSADA, F.; NAGAI, C. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. **Mycologia**, v. 97, 659–666, 2005.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 4th ed; Springer: New York, USA; 2022, 645pp.
- REZENDE, P. H. L.; MENDONÇA, E. P.; DE MELO, R. T.; COELHO, L. R.; MONTEIRO, G. P.; ROSSI, D. A. Aspectos sanitários do queijo Minas artesanal comercializado em feiras livres. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 377, n. 65, 2013

SMITH, D.; ONIONS, A. **Preservation and Maintenance of Living Fungi**. Disponível em:
<https://doi.org/10.1079/9780851989020.0000>

VIANA, G. V. R. **Técnicas para construção de árvores filogenéticas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará. 2007. Disponível em
https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/18678/1/2007_tese_gvrviana.pdf