



**MICHELE DE OLIVEIRA PAIVA ARAGÃO**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS E  
LEVEDURAS EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DAS  
MICRORREGIÕES DO SERRO E SERRA DA CANASTRA**

**LAVRAS – MG**

**2018**

**MICHELE DE OLIVEIRA PAIVA ARAGÃO**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS EM QUEIJO  
MINAS ARTESANAL DAS MICRORREGIÕES DO SERRO E SERRA DA  
CANASTRA**

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

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2018**

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

Aragão, Michele de Oliveira Paiva.

Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em Queijo  
Minas Artesanal das microrregiões do Serro e da Serra da Canastra /  
Michele de Oliveira Paiva Aragão. - 2018.

118 p. : il.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Queijos artesanais. 2. Diversidade. 3. Micobiota terroir. I.  
Batista, Luís Roberto. . II. Título.

**MICHELE DE OLIVEIRA PAIVA ARAGÃO**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS EM QUEIJO  
MINAS ARTESANAL DAS MICRORREGIÕES DO SERRO E SERRA DA  
CANASTRA**

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

APROVADA em 28 de junho de 2018

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Dr. Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior EPAMIG

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

**LAVRAS-MG**

**2018**

*Ao meu marido Aluisio pelo apoio,  
altruísmo e amor incondicional.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me permitir ir atrás dos meus sonhos.

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

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos e também à Capes e ao CNPq pelos recursos para elaboração do trabalho.

Ao professor Luís Roberto Batista por confiar e acreditar em mim e por toda a orientação e conhecimento transmitido.

Às pesquisadoras Fabiana Passamani e Suzana Reis pela paciência, orientação, ajuda e amizade.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, pela disponibilidade e apoio. À Cleuza, do Laboratório de Laticínios pela ajuda com as análises físico-químicas.

Aos produtores de Queijo Minas Artesanal do Serro e da Serra da Canastra pelo fornecimento das amostras pela receptividade, confiança e pelos ensinamentos que não estão nos livros.

Aos amigos do Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos, em especial Nathasha, Lorena, Ligia e Luiz Gustavo. Com ajuda, a amizade de vocês e boas xícaras de café tudo ficou mais fácil.

À Ana Luiza, pelo exemplo de coragem e por, apesar da distância, sempre estar presente.

A todos os meus amigos, especialmente à Isabelle, pela amizade, incentivo, apoio e momentos compartilhados. Vocês são fundamentais em minha vida!

Agradeço especialmente ao Aluisio, aos meus pais Marilei e José Francisco e ao meu irmão João Francisco, pelos conselhos, incentivo e apoio nas minhas escolhas em todos os momentos.

A todas as pessoas que acreditaram em mim e contribuíram de alguma forma para que esse trabalho fosse concluído.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO GERAL

Minas Gerais é o principal estado produtor de queijos artesanais no Brasil. A fabricação deste produto, utilizando leite cru e inóculo endógeno (pingo), combina características geográficas e modo de fazer típicos da região. Baseando-se ainda em técnicas antigas ausentes ou limitadas em processos mecânicos, geralmente dentro do contexto da agropecuária familiar, é importante tanto pela geração de renda quanto por sua conotação sociocultural. Pouco se sabe sobre o perfil microbiológico deste queijo no que concerne aos fungos filamentosos e leveduras que caracterizam o *terroir* das regiões produtoras, sendo importante conhecer os efeitos de tais micro-organismos na maturação do produto. O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade da micobiota *terroir* relacionada ao processo de maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões do Serro e Serra da Canastra, bem como correlacionar as espécies identificadas às características físico-químicas do produto. Para a microrregião do Serro considerou-se também o clima e umidade (verão úmido e inverno seco). As amostras da região do Serro mostraram-se distintas quanto à diversidade de fungos e leveduras, uma vez que a amostra do período de verão/úmido apresentou diversidade, principalmente de fungos filamentosos típicos de solo. Os fungos filamentosos predominantes foram os pertencentes aos gêneros *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Microascus*, *Acremonium* e espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides*, todavia nenhuma potencialmente toxigênica testada apresentou teste positivo para produção de micotoxinas. Em relação às leveduras, os gêneros mais prevalentes foram *Candida*, *Kodamaea*, *Torulaspora*, *Trichosporon* e *Kluyveromyces*. Nos parâmetros físico-químicos, ambas as amostras foram semelhantes. Para a microrregião da Serra da Canastra, a amostra A2 apresentou maior diversidade de leveduras e a amostra A3, maior diversidade de fungos filamentosos, além de maior diversidade micológica no geral. Os fungos filamentosos predominantes foram os pertencentes aos gêneros *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Microascus* e *Acremonium*. Somente a amostra A3 apresentou 8 isolados da espécie *A. ochraceus*, de um total de 12 isolados com teste positivo para produção de Ocratoxina A. Para leveduras, os gêneros de maior destaque foram *Torulaspora*, *Debaryomyces*, *Kodamaea*, *Geotrichum*, *Trichosporon* e *Candida*. Nos parâmetros físico-químicos, houve diferença estatística entre as amostras como exceção do percentual de cloreto de sódio. As espécies identificadas permitiram conhecer mais sobre as comunidades microbianas.

**Palavras-chave:** queijos artesanais. leite cru. diversidade. micobiota *terroir*.

## GENERAL ABSTRACT

Minas Gerais is the main state producing artisanal cheeses in Brazil. The production of this product using raw milk and endogenous inoculum (pingo) combines geographic characteristics and the typical way of doing of the region, still based on old techniques absent or limited in mechanical processes, usually within the context of the family agriculture, is important both for income generation and for its sociocultural connotation. Little is known about the microbiological profile of this cheese in what comprises the filamentous fungi and yeasts that characterize the terroir of the producing regions, being important to know the effects of such microorganisms in the maturation of the product. The objective of this study was to determine the diversity of the mycobiota terroir related to the maturation process of the Artisanal Minas Cheese produced in the micro-regions of Serro and Serra da Canastra, as well as to correlate the species identified with the physical and chemical characteristics of the product. For the Serro microregion, we also considered the climate and humidity (wet summer and dry winter). The samples from the Serro region were different in terms of fungal and yeast diversity, and the summer / wet period sample presented diversity, mainly from typical filamentous fungi. The predominant filamentous fungi were those belonging to the genus *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Microascus*, *Acremonium* and *Cladosporium cladosporioides* complex species. None of the toxoids tested showed a positive test for mycotoxin production; in relation to yeasts, the most prevalent genera were *Candida*, *Kodamaea*, *Torulasporea*, *Trichosporon* and *Kluyveromyces*. In the physical-chemical parameters, both samples were similar. For the Serra da Canastra microregion, the A2 sample had a higher yeast diversity and A3 sample, a greater diversity of filamentous fungi besides a greater mycological diversity in general. The predominant filamentous fungi belonged to the genus *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Microascus* and *Acremonium*, and only the A3 sample showed 8 isolates of the *A. ochraceus* species from a total of 12 isolates with positive test for Ochratoxin A production; for yeasts the most prominent genera were *Torulasporea*, *Debaryomyces*, *Kodamaea*, *Geotrichum*, *Trichosporon* and *Candida*. In the physical-chemical parameters, there was a statistical difference among the samples as an exception of the percentage of sodium chloride. The identified species allowed to know more about the microbial communities.

**Keywords:** artisanal cheeses. raw milk. diversity. mycobiota *terroir*.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 - Fragmentos de vasos de cerâmica provavelmente utilizados para fabricação de queijos.....	17
Figura 2 - Microrregiões produtoras de Queijo Minas Artesanal no estado de Minas Gerais.....	18
Figura 3 - Mapa da microrregião do Serro – MG.....	20
Figura 4 - Mapa da microrregião da Serra da Canastra – MG.....	20
Figura 5 - Fluxograma de produção do Queijo Minas Artesanal.....	23
Figura 6 - Biotransformação da Aflatoxina B1 em Aflatoxina M1.....	28

### CAPÍTULO 2

Figura 1 – Amostra de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro.....	41
Figura 2 - Modelo esquemático de preparo da amostra para técnica de diluição seriada.....	43
Figura 3 - Fluxograma da análise metagenômica.....	47
Figura 4 - Dendograma das leveduras isoladas da amostra A1 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro.....	51
Figura 5 - Dendograma das leveduras isoladas da amostra A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro.....	52
Figura 6 - Dendograma das leveduras isoladas das amostras A1 e A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro.....	53
Figura 7 - Diversidade de espécies de fungos filamentosos e leveduras da amostra A1 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro.....	57
Figura 8 - Diversidade de espécies de fungos filamentosos e leveduras da amostra A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro.....	58

### CAPÍTULO 3

Figura 1 – Amostra de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.....	74
Figura 2 - Modelo esquemático de preparo da amostra para técnica de diluição seriada.....	76
Figura 3 - Fluxograma da análise metagenômica.....	80
Figura 4 - Dendograma das leveduras isoladas da amostra A1 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....	86
Figura 5 - Dendograma das leveduras isoladas da amostra A2 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....	87
Figura 6 - Dendograma das leveduras isoladas da amostra A3 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....	88
Figura 7 - Dendograma das leveduras isoladas da amostra A4 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....	89
Figura 8 - Dendograma das leveduras isoladas das amostras A1, A2, A3 e A4 Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....	90

Figura 9 - Análise de Componentes Principais (PCA) da diversidade micológica e sua correlação com as características físico-químicas das amostras A1, A2, A3 e A4 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....	92
Figura 10 - Diversidade de espécies de fungos filamentosos e leveduras de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.....	95

## LISTA DE GRÁFICOS

### CAPÍTULO 2

- Gráfico 1 - Frequência de ocorrência de espécies de fungos filamentosos presentes nas amostras A1 e A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro.....50
- Gráfico 2 - Abundância relativa de gêneros encontrados nas amostras A1 e A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro.....55

### CAPÍTULO 3

- Gráfico 1 - Frequência de ocorrência de espécies de fungos filamentosos presentes nas amostras A1, A2, A3 e A4 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra.....84
- Gráfico 2 - Abundância relativa de gêneros encontrados nas amostras A1, A2, A3 e A4 de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.....93

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Legislação referente ao Queijo Minas Artesanal (continua).....	21
---	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Amostras de Queijo Minas Artesanal coletadas na microrregião do Serro.....	42
Tabela 2 - Composição físico-química das Amostras A1 e Amostra A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro.....	54

### CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Amostras de Queijo Minas Artesanal coletadas na microrregião da Serra da Canastra.....	75
Tabela 2 - Composição físico-química das Amostras A1, Amostra A2, Amostra A3 e Amostra A4 de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.....	91

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	15
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2.	<b>REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1	<b>Queijos Artesanais</b> .....	17
2.2	<b>Queijos artesanais de Minas Gerais</b> .....	18
2.2.1	<b>Serro</b> .....	19
2.2.2	<b>Serra da Canastra</b> .....	20
2.3	<b>Legislação</b> .....	21
2.4	<b>Processo de produção e maturação</b> .....	23
2.4.1	<b>Terroir</b> .....	24
2.5	<b>Diversidade desejável de fungos filamentosos e leveduras em queijos artesanais</b> .....	26
2.5.1	<b>Diversidade de fungos toxigênicos e suas micotoxinas</b> .....	27
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
	<b>CAPÍTULO 2 Aspectos físico-químicos e diversidade de fungos em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro</b> .....	38
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	39
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
2.1	<b>Amostragem</b> .....	41
2.2	<b>Avaliação da microbiota por método dependente de cultivo</b> .....	43
2.3	<b>Preservação dos isolados</b> .....	44
2.4	<b>Identificação de fungos filamentosos</b> .....	44
2.5	<b>Análises quimiotaconômica de fungos filamentosos potencialmente toxigênicos</b> .....	45
2.6	<b>Identificação das leveduras</b> .....	46
2.7	<b>Avaliação da microbiota por método independente de cultivo</b> .....	46
2.8	<b>Análises físico-químicas</b> .....	48
2.8.1	<b>Umidade</b> .....	49
2.8.2	<b>Cloreto de sódio</b> .....	49
2.8.3	<b>pH</b> .....	49
2.8.4	<b>Gorduras</b> .....	49
2.9	<b>Análise estatística</b> .....	49
3	<b>RESULTADOS</b> .....	50
3.1	<b>Microbiota avaliada pelo método dependente de cultivo</b> .....	50
3.1.1	<b>Fungos filamentosos</b> .....	50
3.1.2	<b>Leveduras</b> .....	51
3.2	<b>Análises físico-químicas</b> .....	54
3.3	<b>Microbiota avaliada pelo método independente de cultivo</b> .....	55
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	60
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68
	<b>CAPÍTULO 3 Aspectos físico-químicos e diversidade de fungos em Queijo Minas Artesanal maturado da microrregião da Serra da Canastra</b> .....	72
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	73
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	74
2.1	<b>Amostragem</b> .....	74
2.2	<b>Avaliação da microbiota por método dependente de cultivo</b> .....	76
2.3	<b>Preservação dos isolados</b> .....	77
2.4	<b>Identificação de fungos filamentosos</b> .....	77

2.5	<b>Análises quimiotação de fungos filamentosos potencialmente toxicogênicos.....</b>	78
2.6	<b>Identificação das leveduras.....</b>	79
2.7	<b>Avaliação da micobiota por método independente de cultivo.....</b>	79
2.8	<b>Análises físico-químicas.....</b>	81
2.8.1	<b>Umidade.....</b>	82
2.8.2	<b>Cloreto de sódio.....</b>	82
2.8.3	<b>pH.....</b>	82
2.8.4	<b>Gorduras.....</b>	82
2.9	<b>Análises estatísticas.....</b>	82
3	<b>RESULTADOS.....</b>	84
3.1	<b>Micobiota avaliada pelo método dependente de cultivo.....</b>	84
3.1.1	<b>Fungos filamentosos.....</b>	84
3.1.2	<b>Leveduras.....</b>	85
3.2	<b>Análises físico-químicas.....</b>	91
3.3	<b>Análise de Componentes Principais (PCA).....</b>	92
3.4	<b>Micobiota avaliada pelo método independente de cultivo.....</b>	93
4	<b>DISCUSSÃO.....</b>	97
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	103
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	104
	<b>ANEXOS.....</b>	108

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

Minas Gerais é o principal estado produtor de queijos artesanais do Brasil, existem aproximadamente 30 mil produtores proporcionando uma produção de mais de 50 mil toneladas anualmente. A fabricação deste produto, geralmente dentro do contexto da agropecuária familiar, é importante tanto pela geração de renda quanto por sua conotação sociocultural (BRANT, et al. 2007; CAMPAGNOLLO, et al. 2018). O Queijo Minas Artesanal (QMA) produzido nas regiões do Serro e Serra da Canastra, patrimônio imaterial de Minas Gerais e do Brasil, possui Indicação Geográfica e representa um produto de grande importância socioeconômica e cultural para as microrregiões produtoras (FURTADO, 1980).

A partir da utilização de leite cru e inóculo endógeno chamado “pingo”, o QMA é produzido e maturado baseando-se em técnicas antigas, ausentes ou limitadas em processos industriais. Desta forma, vê-se a importância da adequação às normas de fabricação higiênico-sanitárias previstas nas atuais legislações. Por ser um alimento produzido de forma artesanal e sem a aplicação de tratamentos térmicos, observa-se a possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos e toxinas (KUPIEC; REVELL, 1998; SANTOS, 2010).

Pouco se sabe sobre o perfil microbiológico do QMA no que se refere aos fungos filamentosos e leveduras que contribuem com o *terroir* das regiões produtoras, sendo de interesse de todos os envolvidos na cadeia de produção conhecer os efeitos de tais micro-organismos na maturação do queijo. Tal conhecimento poderia possibilitar melhorias em todas as etapas de fabricação e capacitação dos produtores visando à melhoria da qualidade do produto final, segurança microbiológica e, conseqüentemente, a ampliação do comércio.

Segundo Montel et al. (2014), a principal preocupação dos defensores de queijos artesanais tradicionais é a preservação da diversidade microbiana nativa a fim de explorar seus benefícios. A associação desta às práticas tradicionais de fabricação corroboraria a manutenção das características sensoriais e baixo índice de patógenos. Entretanto, têm-se observado que as mudanças climáticas podem agir como fator decisivo na seleção de micro-organismos nativos devido à alteração de temperaturas ótimas de desenvolvimento e, até mesmo, favorecendo a produção de metabólitos secundários tóxicos. É importante, pois, o estudo dessas alterações e a preservação dos isolados em Coleções de Cultura de Micro-organismos.

Estudos realizados com QMA's das microrregiões do Serro e Serra da Canastra caracterizaram a microbiota leveduriforme, presente neste produto, capaz de alterar suas características sensoriais por meio de enzimas lipolíticas e proteolíticas e fermentação da lactose. Entretanto, não há ainda trabalhos que determinem a diversidade de fungos filamentosos presentes nos Queijos Artesanais mineiros (BORELLI, et al. 2006; CARDOSO, et al. 2015; ANDRADE, et al. 2017). Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar as características físico-químicas e a microbiota *terroir* (por meio de técnica independente e dependente de cultivo) do Queijo Minas Artesanal, produzido na Serra da Canastra em diferentes propriedades e no Serro em diferentes estações, com verão úmido e inverno seco.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Queijos Artesanais

Queijo é o nome utilizado para um grupo de alimentos produzido à base de leite fermentado, compreendendo uma significativa variedade de sabores e formatos no mundo todo. Esta técnica rudimentar se desenvolveu com objetivo de conservar o leite (FOX, 1993). De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos, aprovado pela Portaria nº 146 de 7 de março de 1996, entende-se por queijo o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

O processamento do leite foi de grande importância para os primeiros agricultores pré-históricos, pois permitiu o consumo de alimentos mais nutritivos e digeríveis sem que houvesse a necessidade de abate dos animais. Análises de gorduras lácteas em fragmentos de vasos de cerâmica perfurados (Figura 1) pertencentes aos povos agricultores que viveram na região da Europa Central há cerca de 7.000 anos, direcionam para o que pode ser a evidência mais antiga de fabricação de queijo no mundo (BOGUCKI, 1984; CURRY, 2013; SALQUE, 2013).

Figura 1 Fragmentos de vasos de cerâmica provavelmente utilizados para fabricação de queijos



Fonte: Salque (2013)

Estima-se que existam mais de 1.000 variedades de queijo produzidas no mundo todo. Dentre essas, os queijos artesanais podem ser definidos como de produção tradicional e singular, limitados em processos mecânicos e em pequena escala. Hoje, tornou-se um alimento de alta gastronomia, sensorialmente distinto, apresentando diversos formatos e características sensoriais. O consumidor é influenciado pela imagem de “artesanal” e “caseiro” dos queijos, principalmente quando comparada à imagem séria dos queijos industriais produzidos em massa (SANDINE; ELLIKER, 1970; FOX, 1993; KUPIEC; REVELL, 1998).

## 2.2 Queijos artesanais de Minas Gerais

Minas Gerais é o estado que mais produz queijos artesanais no país, sendo este certamente um dos produtos mais antigos e importantes para a história do Brasil. Concentrado em pequenas regiões (Figura 2) como Serro, Canastra, Campo das Vertentes, Araxá, Cerrado, Serra do Salitre e Triângulo Mineiro, o QMA é tradicionalmente produzido em pequenas propriedades rurais por todo estado. Devido a variadas técnicas de fabricação desse produto, cada queijo é singular em suas características. Sua consistência pode ser caracterizada como semi-dura, com alto teor de umidade, coloração amarelo-pálida, formato cilíndrico, textura homogeneia e sabor levemente ácido (NOGUEIRA; LUBACHEVSKY; RANKIN, 2005; BOTELHO; MENDES; SENA, 2013; IMA, 2018).

Figura 2 Microrregiões produtoras de Queijo Minas Artesanal no estado de Minas Gerais



Fonte: Portal do Queijo (2017)

Estudos indicam que a origem do QMA remonta às técnicas típicas da Serra da Estrela, em Portugal, trazidas ao Brasil no século XVI pelos colonos portugueses (MENESES, 2006). Entretanto, segundo Netto (2011), a origem da técnica de produção do queijo em Minas veio do arquipélago de Açores por açorianos que se estabeleceram nas cidades de Caeté e Medeiros no século XVIII. Estes já conheciam a técnica de manejo do gado leiteiro de produção de queijo por influência dos holandeses que visitavam o arquipélago naquele tempo (MORENO, 2013).

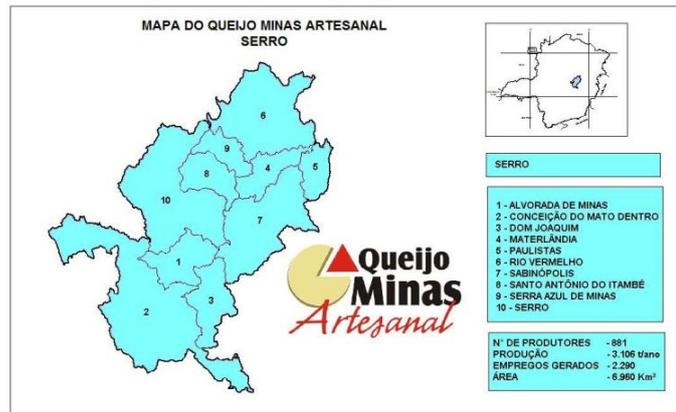
Tanto o QMA do Serro quanto o da Serra da Canastra possuem Indicação Geográfica. Esta é uma importante ferramenta utilizada na proteção de produtos com características diferenciadas como o QMA. Seu registro destaca o produto no mercado agregando valor às regiões, gerando melhorias e garantindo a qualidade e identidade do produto, diferenciando-o no mercado consumidor, em decorrência de suas características geográficas, históricas e socioculturais (INPI, 2011).

### **2.2.1 Microrregião do Serro**

A microrregião do Serro fica localizada no Vale do Jequitinhonha, região da Serra do Espinhaço e da Estrada Real, no estado de Minas Gerais. O clima da região é classificado como temperado úmido, com inverno seco e verão quente, de acordo como a classificação de Köppen e Geiger. A temperatura média anual é de 20,5 °C, variando entre 23,2 °C e 17,3 °C, sendo agosto o mês mais seco e dezembro, o mês mais chuvoso (CLIMATE-DATA.ORG, 2018).

Caracterizada por ricas tradições e valores culturais, a região produz aproximadamente 3 mil toneladas de queijo anualmente, englobando os municípios de Alvorada de Minas, Coluna, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas e Serro (NUNES; DE MELO, 2013; IEPHA, 2017) (Figura 3).

Figura 3 Mapa da microrregião do Serro - MG



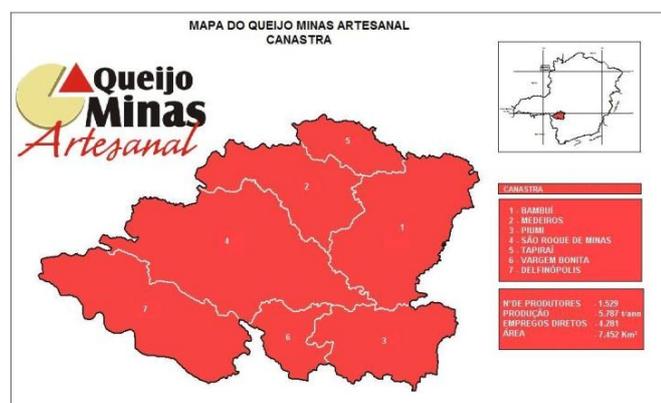
Fonte: EMATER (2018)

### 2.2.2 Microrregião da Serra da Canastra

Localizada no sudoeste do Estado de Minas Gerais, a microrregião da Serra da Canastra abriga o Parque Nacional da Serra da Canastra. O clima da região é temperado úmido, com inverno seco e verão quente, de acordo como a classificação de Köppen e Geiger. A temperatura média anual é de 20,6 °C, variando entre 23,2 °C e 16,8 °C, sendo agosto o mês mais seco e dezembro, o mês mais chuvoso (CLIMATE-DATA.ORG, 2018).

Por meio da Portaria nº 694 de 17 de novembro de 2004 (IMA, 2004), o Instituto Mineiro de Agropecuária incluiu a microrregião da Canastra, composta pelos municípios de Bambuí, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita e Delfinópolis, como produtora de QMA (Figura 4).

Figura 4 Mapa da microrregião da Serra da Canastra – MG



Fonte: EMATER (2018)

### 2.3 Legislação

O Brasil, nos últimos anos presencia uma revolução quanto às mudanças que vêm acontecendo em torno da legislação de queijos artesanais fabricados a partir de leite cru. O estado de Minas Gerais toma frente no que se refere à regulamentação do Queijo Minas Artesanal, servindo de exemplo para que pequenos produtores de outros estados se articulem quanto às necessidades de certificação. (PINTO, 2008). Desde 2002, com a criação da Lei Estadual nº 14.185 que dispôs sobre o processo de produção do QMA, várias melhorias foram implantadas, como o estabelecimento de boas práticas de fabricação, indicação geográfica, diminuição do tempo mínimo de maturação a partir de estudos científicos e registro e regularização dos produtores. No entanto, ainda são necessárias outras adequações na legislação já que esta não inclui os queijos mofados e nem permite a exportação do produto. A Tabela 1 se refere à legislação que envolve o QMA.

Tabela 1 Legislação referente ao Queijo Minas Artesanal (continua)

<b>Legislação</b>	<b>Data</b>	<b>Assunto</b>
Lei Estadual nº 14.185	31 de janeiro de 2002	Dispõe sobre o processo de produção.
Decreto nº 42.505	15 de abril de 2002	(altera Lei Estadual nº 14.185/2002) Institui as formas de registros de bens culturais de natureza imaterial ou intangível que constituem patrimônio cultural de Minas Gerais.
Decreto Nº 42.645	05 de junho de 2002	(Altera regulamento da Lei Nº 14.185/2002) Autoriza a produção de queijos utilizando o leite cru, sem utilização de técnicas industriais, produzidos em microrregiões tradicionais.
Portaria nº 517	14 de junho de 2002	Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de QMA.
Portaria nº 518	14 de junho de 2002	Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do QMA.
Portaria nº 523	3 de julho de 2002	Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do QMA.
Decreto Estadual Nº 44.864	1º de agosto de 2008	(Altera regulamento da Lei Nº 14.185/2002) Determina parâmetros microbiológicos para o QMA.

Tabela 1 (conclusão)

Lei Estadual nº 19.492	13 de janeiro de 2011	(Altera Lei Estadual nº 14.185/2002) Trata de certificação diferenciada para os QMA's produzidos conforme a tradição histórica e cultural da região.
Instrução Normativa nº 57	15 de dezembro de 2011	Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais.
Portaria nº 818	12 de dezembro de 2006	Estabelece as normas higiênico-sanitárias e boas práticas de produção.
Lei Estadual nº 20.549	18 de dezembro de 2012	(Revoga Lei Estadual nº 14.185/2002) Dispõe sobre a produção e a comercialização do QMA.
Portaria nº 1305	30 de abril de 2013	Estabelece diretrizes para a produção do QMA.
Instrução Normativa Nº 30	7 de agosto de 2013	(revogada Instrução Normativa nº 57/2011) Defini novo período de maturação para queijos artesanais
Instrução Normativa Nº 16	23 de junho de 2015	Estabelece normas nacionais específicas de inspeção e a fiscalização sanitária de produtos de origem animal, referente às agroindústrias de pequeno porte.
Instrução Normativa Nº 5	14 de fevereiro de 2017	Estabelece requisitos para avaliação relativos à estrutura física, dependências e equipamentos de estabelecimento agroindustrial de pequeno porte de produtos de origem animal.
Portaria Nº 1736	27 de julho de 2017	(altera Portaria nº 1305/2013) Dispõe sobre o período de maturação do QMA.
Instrução Normativa Nº 9	18 de janeiro de 2018	(altera Instrução Normativa nº 05/2017) Estabelece os requisitos técnicos relativos à estrutura física, às dependências e aos equipamentos dos estabelecimentos agroindustriais de pequeno porte de produtos de origem animal.

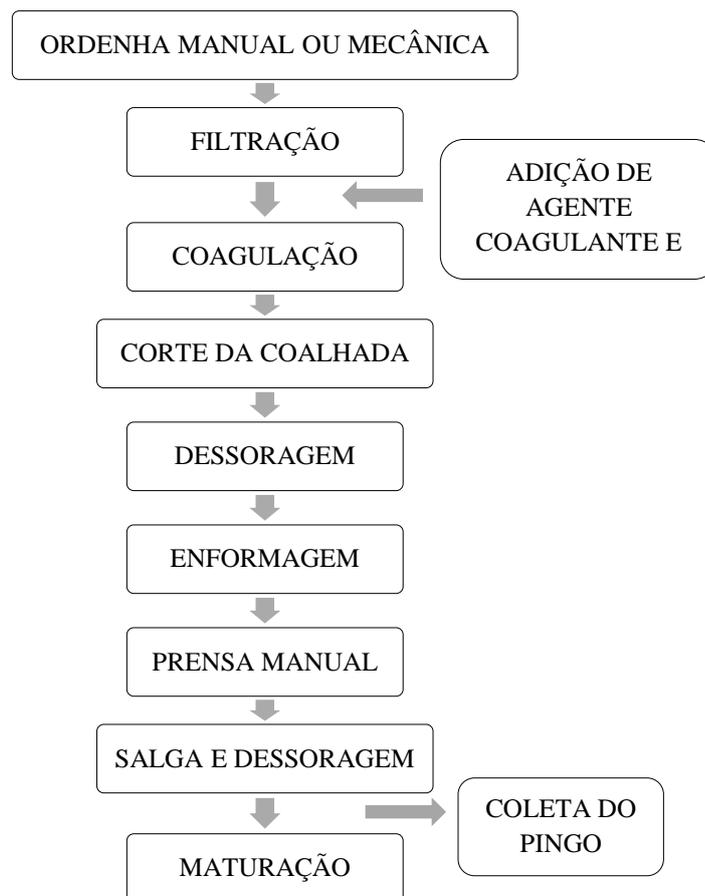
Fonte: MINAS GERAIS (2002a); IEPHA (2002); MINAS GERAIS (2002b); IMA (2002a); IMA (2002b); IMA (2002c); IMA (2006); MINAS GERAIS (2008); MINAS GERAIS (2011); BRASIL (2011); MINAS GERAIS (2012); BRASIL (2013); IMA (2013); BRASIL (2015); BRASIL (2017); IMA (2017); BRASIL (2018).

## 2.4 Processo de produção e maturação

O QMA é fabricado a partir de leite cru, adquirido por meio da ordenha realizada na mesma propriedade queijeira. O processo de fabricação difere pouco entre as microrregiões. Uma das diferenças consiste no fato de que na região do Serro, a prensagem da massa ocorre sem auxílio de tecido. Todavia, as características finais de cada queijo são particulares de cada região produtora (DAS DORES; FERREIRA, 2012).

Juntamente com o coalho e o sal, adiciona-se o “pingo” ao leite, que consiste em parte do soro coletado após a prensagem do queijo do dia anterior. Este inóculo endógeno, rico em micro-organismos autóctones, contribui para a fermentação e maturação do produto (NÓBREGA, 2012). Na Figura 5, observa-se o fluxograma geral de produção do QMA.

Figura 5 Fluxograma de produção do Queijo Minas Artesanal



Fonte: Autora (2018) adaptado de Martins (2006)

A etapa final do processo é a maturação, de grande importância na seleção e melhoria das características do queijo. Ocorre após o processo de fabricação e pode variar quanto ao tempo, podendo chegar a dois anos, em função do tipo de queijo produzido. De acordo com o artigo 1º da Portaria nº 1.736 de 27 de julho de 2017 (IMA, 2017), fica definido o período de maturação do Queijo Minas Artesanal como mínimo de 17 (dezesete) dias para a microrregião do Serro e de 22 (vinte e dois) dias para a microrregião da Serra da Canastra. A maturação causa alterações químicas e físicas na massa do queijo, na textura e na consistência, devido à ação de enzimas e produz compostos que influenciarão no aparecimento de sabores e aromas característicos. (FOX; McSWEENEY, 1998).

As alterações bioquímicas que ocorrem durante a maturação podem ser agrupadas em eventos primários (lipólise, proteólise, metabolismo da lactose residual, do lactato e citrato) ou secundários (metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos). A lipólise é catalisada por lipases, provenientes principalmente da microbiota do leite, e por enzimas do agente coagulante. A proteólise é o evento bioquímico mais complexo que ocorre durante a maturação e é catalisada por enzimas como a plasmina e, também, por proteinases e peptidases provenientes de bactérias do ácido lático e de outros micro-organismos que crescem dentro ou sobre o queijo (McSWEENEY, 2004).

Queijos produzidos a partir de leite cru maturam mais rapidamente e adquirem sabores mais ricos e intensos que os queijos de leite pasteurizado ou microfiltrado. Esta característica tem sido observada tanto em queijos cozidos de leite de vaca, como em queijos de cabra e ovelha (ALONSO, et al. 2013). Esses queijos têm geralmente quantidades maiores de compostos aromáticos (ácidos, aldeídos, álcoois, ésteres e compostos de enxofre), com exceção de algumas cetonas. Os efeitos da microbiota do leite cru na textura diferem de acordo com a variedade de queijo e as condições de processamento (BEUVIER, et al. 2004). Outros fatores que interferem diretamente nas características sensoriais do queijo referem-se às características do leite que dependem do tipo de alimentação, raça e estado de saúde do animal (COULON, 2004).

#### **2.4.1 Terroir**

*Terroir* é uma palavra intraduzível de origem francesa e está relacionada ao território e ao ambiente peculiar de uma região que irá expressar a qualidade, tipicidade e identidade de um vinho ou produto (TONIETTO, 2007). Refere-se basicamente a um sistema de interações

entre fatores biofísicos e humanos que foram construídos durante a história e são específicos de uma área geográfica limitada (MARTIN, et al. 2016). Segundo Paxson & Helmreich (2014) há um crescente interesse por parte dos produtores de queijos artesanais em um microrganismo ou microbiota autóctone de sua queijaria como forma de reivindicar seu *terroir* para se distinguir em um nicho de mercado cada vez mais competitivo. Contudo, uma microbiota particular de um queijo não é a localização geográfica estritamente dimensionada de uma propriedade ou região. Condições ambientais que geram comunidades microbianas particulares podem se adaptar a um queijo e não a uma região geográfica. Enólogos franceses há muito argumentam que o lugar do *terroir* não é redutível à geografia, mas emerge da conjunção de condições ambientais e práticas culturais realizadas em uma localidade específica ao longo de sucessivas gerações humanas que põem em prática um modelo de colaboração ecológica (DEMOSSIER, 2011; TEIL, 2012).

Supõe-se que queijos feitos e maturados nas mesmas regiões geográficas teriam composição microbiana mais similar do que aqueles fabricados em locais mais distantes. Porém, estudos que avaliaram um conjunto de dados para a Europa e os Estados Unidos mostraram que a composição da comunidade não está significativamente correlacionada com a distância geográfica (WOLFE, et al. 2014).

De acordo com Clark & Kerr (2017), embora muitas Indicações Geográficas tenham como premissa a propriedade intelectual baseada em processos artesanais e, provavelmente não sejam afetadas por mudanças climáticas, outras são baseadas no *terroir*, que é definido também por qualidades geográficas específicas como solo, umidade, luz solar, entre outras que estão diretamente relacionadas às condições climáticas.

Segundo Martin, et al. (2016), a composição botânica e a biodiversidade específica das pastagens de montanha, como observa-se no relevo típico do estado de Minas Gerais, são regidas por condições geoclimáticas e práticas agronômicas (adubação, densidade de estocagem, manejo de pastoreio) e têm uma influência direta na composição do queijo. É sabido que a qualidade do queijo de leite cru depende da composição físico-química do leite e suas características predizem o *terroir* de onde o leite é produzido. Micro-organismos autóctones do leite e do ambiente da queijaria também são fatores importantes para a qualidade do produto, pois sua atividade enzimática contribui muito para as características sensoriais do queijo, típicas do seu *terroir*. Portanto, a diversidade de aromas do queijo está diretamente ligada à diversidade da microbiota (CASALTA, et al. 2009; DONNELLY; KEHLER, 2016).

## 2.5 Diversidade desejável de fungos filamentosos e leveduras em queijos artesanais

A microbiota do queijo é o principal fator que altera e intensifica o sabor, aroma, textura e aparência do produto. A quantidade e a diversidade de micro-organismos presentes no queijo dependem das condições de fabricação e manipulação, da qualidade do leite, das condições ambientais (temperatura e umidade) e da exposição do queijo a micro-organismos durante e após a fabricação (BERESFORD, et al. 2001; OGIER, et al. 2002; TORKAR; TEGER, 2006; IRLINGER; MOUNIER, 2009).

O leite cru é rico em nutrientes e fornece as condições adequadas para o crescimento de várias espécies de micro-organismos. Sua ocorrência é influenciada pelo estado de saúde do animal, tempo e criação de condições fisiológicas favoráveis. Em queijos fabricados a partir de leite cru, comumente encontra-se os fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Fusarium*. Embora algumas espécies dos gêneros *Penicillium* e *Mucor* sejam essenciais na maturação de alguns tipos de queijo, devido à capacidade de alterar sabor e aroma, somente *Geotrichum candidum* é reconhecido como fungo de leite. Morfologicamente, o *G. candidum* é descrito como um “fungo do tipo levedura” porque aparece microscopicamente com ambos os estágios: filamentoso e unicelular (GUÉGUEN; SCHMIDT, 1992; WOUTERS, 2002; CALLON, et al. 2007; LAVOIE, et al. 2012; BUDAK, et al. 2016). A atuação dos fungos filamentosos no processo de maturação dos queijos é de fato importante. A degradação dos constituintes do leite, como proteínas e lipídios, devido à ação de enzimas fúngicas pode levar à melhoria da qualidade da textura, do sabor e do valor nutricional do queijo (HYMERY, 2014).

As leveduras mais presentes em queijos são as pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Yarrowia* e *Zygosaccharomyces*. Embora sejam encontrados vários gêneros, a espécie mais comumente isolada de queijos é *Debaryomyces hansenii* (BÜCHL; SEILER, 2011). Medina-Córdova et al. (2018) mostraram que *D. hansenii* pode afetar a esporulação e o crescimento dos fungos filamentosos micotoxigênicos devido a sua atividade de controle biológico além de ter potencial probiótico (ŠURANSKÁ, 2016).

Segundo Cardoso et al. (2015), a diversidade de espécies de leveduras encontradas QMA da microrregião do Serro está diretamente relacionada com o tempo de maturação e não com as estações do ano. Neste estudo, observou-se que as espécies de leveduras mais encontradas foram *D. hansenii*, *Kodamaea ohmeri* e *Kluyveromyces marxianus*. Estas leveduras podem representar boas culturas iniciais na produção do Queijo Minas Artesanal

devido ao potencial enzimático das mesmas, que colabora para o consumo de lactato, formação de metabólitos alcalinos, fermentação da lactose, lipólise, proteólise e a formação de compostos aromáticos, entre outras atividades que são importantes para as características típicas do queijo. Em outro estudo, Andrade et al. (2017) identificaram em amostras de QMA da Serra da Canastra as leveduras *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspota delbrueckii* e *Candida intermedia* que mostraram-se importantes para agregar sabor e aroma ao queijo devido à produção de compostos aromáticos voláteis.

### 2.5.1 Diversidade de fungos toxigênicos e suas micotoxinas

Fungos filamentosos toxigênicos (produtores de micotoxinas) estão amplamente distribuídos nas regiões produtoras de alimentos, como cultivos de cereais e outras *commodities*. Os principais gêneros de fungos toxigênicos são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (PITT, 2000).

As micotoxinas são metabólitos secundários, ou seja, não têm papel no metabolismo e crescimento dos fungos filamentosos. São potencialmente tóxicas tanto para o homem quanto para os animais devido ao potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico. E, embora sejam prejudiciais, não induzem resposta imunológica imediata. (BULLERMAN; SCHOEREDER; PARK, 1984; PITT, 2000; TORKAR; VENGUŠT, 2008).

Micotoxinas podem ser encontradas em produtos lácteos por dois motivos: contaminação indireta, que ocorre quando as vacas leiteiras ingerem rações contendo micotoxinas ou contaminação direta, que ocorre devido ao crescimento intencional ou acidental de fungos filamentosos. Em decorrência disso, a presença de uma micotoxina em produtos lácteos não necessariamente está relacionada com a presença de um fungo filamentoso contaminante. Ela pode representar um indicativo de que a toxina foi ingerida juntamente com a alimentação animal. Por serem resistentes, podem permanecer no alimento mesmo após a eliminação do microrganismo. Uma determinada toxina pode ser produzida por mais de uma espécie de fungo filamentoso, bem como um fungo filamentoso pode produzir mais de uma micotoxina (MONTAGNA, et al. 2004; SENGUN, YAMAN; GONUL, 2008; ABREU, 2011)

Durante a maturação pode haver o crescimento de fungos na superfície do queijo, alterando sua aparência e sabor (LUND; FILTENBORG; FRISVAD, 1995). De acordo com Northolt et al. (1980), com o desenvolvimento do fungo é possível que haja o risco de

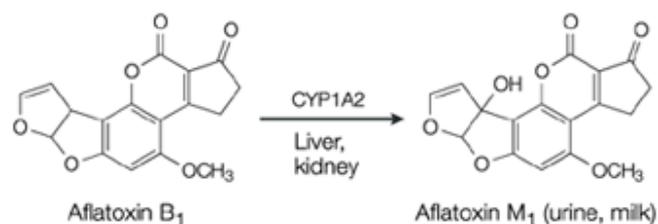
produção de micotoxinas. Após analisarem queijos contaminados por *Aspergillus versicolor*, observaram que nove das 39 amostras continham esterigmatocistina. Lund; Filtenborg & Frisvad (1995) determinaram a micobiota da superfície de queijos semi-macios e perceberam que todos os isolados de *Penicillium commune* produziram ácido ciclopiazônico.

Para eliminar ou diminuir os níveis de micotoxinas presentes nos alimentos e rações, ou até mesmo degradá-las ou torná-las menos tóxicas, utilizam-se métodos físicos, químicos e biológicos. Entretanto, a melhor maneira de evitar micotoxinas em produtos lácteos é evitar a contaminação por fungos filamentosos, uma vez que existem limitações nos processos de degradação ou desintoxicação (SENGUN, YAMAN; GONUL, 2008).

As micotoxinas mais comuns e estáveis no queijo são a citrinina, o penitrem A, a roquefortina C, a esterigmatocistina e a aflatoxina. Por outro lado, a patulina, o ácido penicílico e a toxina PR não persistem no queijo (SENGUN, YAMAN; GONUL, 2008). Contudo, a principal micotoxina encontrada no leite é a aflatoxina. As Aflatoxinas são micotoxinas produzidas pelas espécies *Aspergillus flavus*, *A. bombycus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. ochraceoroseus*, *A. tamarrii*, *A. pseudotamarrii*, *A. parvisclerotigenus*, *A. rambellii* e algumas espécies da Seção *Nidulantes* do gênero *Aspergillus* (*Emericella*). Como contaminante de produtos agrícolas, sabe-se de quatro tipos de Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), sendo as mais toxigênicas as B1 e G1. As denominações B e G são em função das colorações azul (blue) e verde (green) que aparecem quando expostas à luz ultravioleta (JAY, 2005; FRISVAD; SKOUBOE; SAMSON, 2005; PRANDINI et al., 2009; ABREU, 2011).

A principal preocupação em relação à contaminação indireta com micotoxinas em produtos lácteos está associada ao metabolismo da Aflatoxina B1 por bovinos em lactação após ingestão de rações contaminadas, produzindo então a Aflatoxina M1 (Figura 6), associada ao leite e não ao crescimento de fungos toxigênicos em produtos lácteos (HYMERY, et al. 2014; BANJARA; SUHR; HALLEN-ADAMS, 2015).

Figura 6 Biotransformação da Aflatoxina B1 em Aflatoxina M1



Fonte: Adaptado de Kensler, et al. (2003)

Em 18 de fevereiro de 2011, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foi estabelecido na RDC nº 7 que o limite máximo tolerado de Aflatoxina M1 em queijos é de 250 ng/kg (BRASIL, 2011). Segundo Anfossi e colaboradores (2012), o limite permitido de Aflatoxina M1 em queijos pela legislação vigente na União Europeia é de 50 ng/kg.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, A. N. I. **Contagem microbiana e incidência de aflatoxina M1 em queijo ralado e requeijão comercializado em diferentes cidades do estado de Minas Gerais**. Dissertação (mestrado em Ciência dos Alimentos), 68 p. – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2011.
- ALONSO, R. et al. Proteolysis, lipolysis, volatile compounds and sensory characteristics of Hispánico cheeses made using frozen curd from raw and pasteurized ewe milk. **Journal of dairy research**, v. 80, n. 1, p. 51-57. 2013.
- ANDRADE, R. P. et al. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food research international**, v. 91, p. 72-79, 2017.
- ANFOSSI, L. et al. Occurrence of aflatoxin M 1 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(1), 125-130. 2012.
- BRASIL. **Portaria nº 146, de 7 de março de 1996**. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, 1996. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>> Acesso em 03 de junho de 2018.
- BRASIL. **Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC\\_07\\_2011\\_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966) > Acesso em 23 de maio de 2018.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 57, de 15 de dez de 2011**. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674&tipoLegis=A>> Acesso em 29 de maio de 2018.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 30, de 7 de ago de 2013**. Define novo período de maturação dos queijos artesanais. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674&tipoLegis=A>> Acesso em: 29 de maio de 2018.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 16, de 23 de jun de 2015**. Estabelece em todo o território nacional as normas específicas de inspeção e a fiscalização sanitária de produtos de origem animal, referente às agroindústrias de pequeno porte. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674&tipoLegis=A>> Acesso em: 29 de maio de 2018.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 5, de 14 de fev de 2017**. Dispõe sobre requisitos para avaliação de equivalência ao Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária relativos à estrutura física, dependências e equipamentos de estabelecimento agroindustrial de pequeno porte de produtos de origem animal. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <

[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sisbi-1/legislacao/InstruoNormativa\\_05.2017.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sisbi-1/legislacao/InstruoNormativa_05.2017.pdf)> Acesso em: 29 de maio de 2018.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 9, de 18 de jan de 2018**. Estabelece os requisitos técnicos relativos à estrutura física, às dependências e aos equipamentos dos estabelecimentos agroindustriais de pequeno porte de produtos de origem animal. Brasília, DF, 2018. Disponível em: < <https://alimentusconsultoria.com.br/instrucao-normativa-9-janeiro-2018-mapa/>> Acesso em: 29 de maio de 2018.

BEUVIER, E. et al. Raw milk cheeses, *Cheese: Chemistry, Physics & Microbiology*, 3rd ed., vol. 1. **Elsevier Ltd.**, London, pp. 319–345. 2004.

BOTELHO, B. G.; MENDES, B. A. P.; SENA, M. M. Implementação de um método robusto para o controle fiscal de umidade em queijo minas artesanal. *Abordagem metrológica multivariada. Quim Nova*, v. 36, p. 1416-1422, 2013.

BÜCHL, N. R.; SEILER, H. **Yeast and molds**: yeasts in milk and dairy products. In: John W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, San Diego, 2nd ed. pp. 744–753. 2011.

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

BULLERMAN, L. B.; SCHROEDER; L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Jornal of Food Protection**, Des moines, v. 47, n. 8, p. 637-646, Aug. 1984.

BANJARA, N.; SUHR, M. J.; HALLEN-ADAMS, H. E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. **Current microbiology**, 70(6), 792-800. 2015.

BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheeses microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

BOGUCKI, P. I. Ceramic sieves of the Linear Pottery Culture and their economic implications. **Oxford Journal of Archaeology**, v. 3, n. 1, p. 15-30, 1984.

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

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.

CALLON, C. et al. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. **Systematic and applied microbiology**, v. 30, n. 7, p. 547-560, 2007.

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: the cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. **Food Control**, 2018.

CARDOSO, V. et al. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69, p. 331-340, 2015.

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

CLARK, L. F.; KERR, W. A. Climate change and terroir: The challenge of adapting geographical indications. **The Journal of World Intellectual Property**, v. 20, n. 3-4, p. 88-102, 2017.

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

COULON, J. B. et al. Relationships between ruminant management and sensory characteristics of cheeses: a review. **Le Lait**, v. 84, n. 3, p. 221-241, 2004.

CURRY, A. The milk revolution. **Nature**, v. 500, n. 7460, p. 20, 2013.

DAS DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. de L. F. Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 2, n. 2, p. 26-34, 2012.

DEMOSSIER, M. Beyond terroir: territorial construction, hegemonic discourses, and French wine culture. **Journal of the Royal Anthropological Institute**, 17(4), 685-705. 2011.

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

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Mapa do queijo Minas artesanal**. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>> Acesso em: 22 de maio de 2018.

FOX, P. F. Cheese: an overview. In: **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. Springer, Boston, MA. 2nd ed., p. 1-36, 1993.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Chemistry and biochemistry of cheese and fermented milks. Dairy chemistry and biochemistry. London: **Blackie Academic & Professional**, cap. 10, p. 403-418, 1998.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and applied microbiology**, v. 28, n. 5, p. 442-453, 2005.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.35, p.33-36, 1980;

GUÉGUEN M.; SCHMIDT, J. L. Les levures et Geotrichum candidum,. In Hermier J, Lenoir J, Weber F (ed), **Les Groupes Microbiens d'Intérêt Laitier**. CEPIL, Paris, France. p. 165–219, 1992.

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

INSTITUTO ESTADUAL DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO DE MINAS GERAIS. **Decreto n. 42.505 de 15 de abr de 2002**. Institui as formas de Registros de Bens Culturais de Natureza Imaterial ou Intangível que constituem patrimônio cultural de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 2002. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?num=42505&ano=2002&tipo=DEC>> Acesso em: 29 de maio de 2018.

INSTITUTO ESTADUAL DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO DE MINAS GERAIS. **O Modo de fazer o queijo artesanal da região do Serro**. Belo Horizonte, 2017. Disponível em: <<http://www.iepha.mg.gov.br>>. Acesso em: 28 de maio de 2018.

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

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 517, de 14 de jun de 2002**. Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 2002a. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc\\_details/209-portaria-no-517-de-14-de-junho-de-2002](http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/209-portaria-no-517-de-14-de-junho-de-2002)> Acesso em 29 de maio de 2018.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 518, de 14 de jun de 2002**. Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 2002b. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc\\_details/210-portaria-no-518-de-14-de-junho-de-2002](http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/210-portaria-no-518-de-14-de-junho-de-2002)>. Acesso em 29 de maio de 2018.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 523, de 3 de jul de 2002**. Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 2002c. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc\\_details/212-portaria-no-523-de-3-de-julho-de-2002r](http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/212-portaria-no-523-de-3-de-julho-de-2002r)>. Acesso em 29 de maio de 2018.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004**. Identifica a microrregião da Canastra. Belo Horizonte, 2004. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br>>. Acesso em 28 de maio de 2018.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 818, de 12 de dez de 2006**. Baixa o regulamento técnico de produção do queijo minas artesanal e dá outras providências.. Belo Horizonte, 2006. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc\\_details/338-portaria-no-818-de-12-de-dezembro-de-2006](http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/338-portaria-no-818-de-12-de-dezembro-de-2006)>. Acesso em 29 de maio de 2018.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 1.305, de 30 de abr de 2013**. Estabelece diretrizes para a produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2013.

Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc\\_details/1159-portaria-1305](http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/1159-portaria-1305)>. Acesso em 29 de maio de 2018.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 1.736, de 27 de jul de 2017.** Altera a Portaria nº 1305/2013, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2017. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc\\_details/3521-portaria-no-1736](http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/3521-portaria-no-1736)>. Acesso em 29 de maio de 2018.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **O programa do Queijo Minas Artesanal.** Belo Horizonte. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/queijo-minas-artesanal>>. Acesso em: 21 de maio de 2018.

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

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 712 p., 6 ed., 2005.

KENSLER, T. W. et al. Translational strategies for cancer prevention in liver. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 321, 2003.

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

LAVOIE, K. et al. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. **Dairy science & technology**, 92(5), 455-468, 2012.

LUND, F.; FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. Associated mycoflora of cheese. **Food Microbiology**, v. 12, p. 173-180, 1995.

MARTIN, B. et al. The contribution of mountain pastures to the link to terroir in dairy and meat products. **Options Méditerranéennes**, A no. 116, 2016.

MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo minas artesanal da região do Serro.** 146 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006.

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

MEDINA-CÓRDOVA, N. et al. O uso potencial de *Debaryomyces hansenii* para o controle biológico de fungos patogênicos em alimentos. **Controle Biológico**, 2018.

MENESES, J. N. C. **Queijo Artesanal de Minas. Patrimônio Cultural do Brasil – Dossiê interpretativo.** Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional – IPHAN. V1. Belo Horizonte, maio de 2006.

MINAS GERAIS. **Lei n. 14.185, de 31 de jan. de 2002.** Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e da outras providencias. Belo Horizonte, MG, 2002a. Disponível em: <[http://ns.ima.mg.gov.br/intranet/nova/gce/outros\\_documentos/42645.pdf](http://ns.ima.mg.gov.br/intranet/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf)> Acesso em: 29 de maio de 2018.

MINAS GERAIS. **Decreto n. 42.645 de 5 de jun. de 2002.** Aprova regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, MG, 2012b. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=DEC&num=42645&ano=2002>> Acesso em: 29 de maio de 2018.

MINAS GERAIS. **Decreto n. 44.864, de 01 de ago de 2008.** Altera o regulamento da Lei Nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, MG, 2008. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=DEC&num=44864&ano=2008>> Acesso em: 29 de maio de 2018.

MINAS GERAIS. **Lei. 19.492 de 13 de jan. de 2011.** Altera dispositivos da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte, MG, 2011. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=19492&ano=2011>> Acesso em: 29 de maio de 2018.

MINAS GERAIS. **Lei nº 20.549 de 18 de dez de 2012.** Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo, Horizonte, MG, 2012. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=20549&comp=&ano=2012>> Acesso em: 29 de maio de 2018.

MONTAGNA, M. T. et al. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. **Mycopathologia**, v. 158, n. 2, p. 245-249, 2004.

MONTEL, M. C. et al. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. **International journal of food microbiology**, 177, 136-154. 2014.

MORENO, V. J. **Caracterização física e físico-química do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes.** 132 p. Dissertação (Mestrado profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. 2013.

NETTO, M. M. **A geografia do queijo minas artesanal.** 2011. 420 p. Tese (Doutorado em Geografia) – Universidade Estadual Paulista - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro – São Paulo, 2011

NÓBREGA, J. E. **Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais.** 128 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

- NOGUEIRA, M. C. L.; LUBACHEVSKY, G.; RANKIN, S. A.; A study of the volatile composition of Minas cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 555-563, 2005.
- NORTHOLT, M. D. et al. Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese. **J.Assoc. Off. Anal. Chem.** vol. 63, p. 115-119, 1980.
- NUNES, K. S.; DE MELLO, R. C. Um estudo de caso sobre a indicação geográfica como estratégia para comercialização do Queijo Minas Artesanal do Serro. **Rev Eletr Admin Ciênc Contábeis**, v. 2, n. 1, p. 1-20, 2013.
- OGIER, J. C. et al. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. **Appl Environ Microbiol** 68:3691–3701. 2002.
- PAXSON, H.; HELMREICH, S. The perils and promises of microbial abundance: Novel natures and model ecosystems, from artisanal cheese to alien seas. **Social Studies of Science**, v. 44, n. 2, p. 165-193, 2014.
- PINTO, M. S. **Efeito da Microbiota Endógena e da Nisina sobre Listeria sp. e Staphylococcus aureus em queijo Minas artesanal do Serro**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), 71 p. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British medical bulletin**, v. 56, n. 1, p. 184-192. 2000.
- PORTAL DO QUEIJO, 2017. **Queijo Minas Artesanal: surpreenda-se em um roteiro pelas regiões produtoras**. Disponível em: <<http://portaldoqueijo.com.br/noticias/2017/07/11/queijo-minas-artesanal-surpreenda-se-em-um-roteiro-pelas-regioes-produtoras/>> Acesso em: 20 de agosto de 2018.
- PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 984-991, 2009.
- SALQUE, M. et al. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 522, 2013.
- SANDINE, W.E.; ELLIKER, P.R. Microbially induced flavors and fermented foods. Flavor in fermented dairy products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 18, p. 557-562. 1970.
- SANTOS, A.S. **Queijo minas artesanal da microrregião do Serro-MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação**. 67p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.
- SENGUN, I.; YAMAN, D. B.; GONUL, S. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 3, p. 291-298, 2008.
- ŠURANSKÁ, H. et al. Characterisation of the yeast and mould biota in traditional white pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques. **Folia microbiologica**, v. 61, n. 6, p. 455-463. 2016.

TEIL, G. No such thing as terroir? Objectivities and the regimes of existence of objects. **Science, Technology, & Human Values**, 37(5), 478-505. 2012.

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

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

TORKAR, K. G.; VENGUŠT, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. **Food Control**, v. 19, n. 6, p. 570-577, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Biblioteca Universitária. **Manual de normalização e estrutura de trabalhos acadêmicos:** TCCs, monografias, dissertações e teses. 2. ed. rev., atual. e ampl. Lavras, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/11017>>. Acesso em: 07 de maio de 2018.

WOLFE, B.E.; et al. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. **Cell**, vol. 158, p. 422–33, 2014.

WOUTERS, J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 91-109, 2002.

## CAPÍTULO 2

### Aspectos físico-químicos e diversidade de fungos em Queijo Minas Artesanal maturado da microrregião do Serro

#### RESUMO

Minas Gerais é o principal estado produtor de queijos artesanais no Brasil. A fabricação deste produto, geralmente dentro do contexto da agropecuária familiar, é importante tanto pela geração de renda quanto por sua conotação sociocultural. A partir da utilização de leite cru e inóculo endógeno chamado “pingo”, o Queijo Minas Artesanal é produzido e maturado baseando-se ainda em técnicas antigas ausentes ou limitadas em processos industriais. Pouco se sabe sobre o perfil microbiológico deste queijo no que compreende aos fungos filamentosos e leveduras que contribuem para o *terroir* das regiões produtoras, sendo de interesse de todos os envolvidos na cadeia de produção conhecer os efeitos de tais microorganismos nas características do produto. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar no período do inverno e verão a diversidade da microbiota *terroir* relacionada com o Queijo Minas Artesanal produzido na microrregião do Serro bem como suas características físico-químicas. As amostras analisadas na região do Serro mostraram-se distintas quanto à diversidade de fungos e leveduras, sendo que a amostra maturada no período de verão/úmido apresentou diversidade, principalmente de fungos filamentosos típicos de solo. Os principais gêneros de fungos filamentosos encontrados na amostra do verão/úmido foram *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Microascus*, *Acremonium* e espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides*, sendo que nenhuma das espécies potencialmente micotoxigênicas apresentaram teste positivo para produção de micotoxinas; em relação às leveduras os gêneros mais prevalentes foram *Candida*, *Kodamaea*, *Torulaspota* e *Trichosporon*. Na amostra do inverno/seco destacou-se o fungo filamentoso *Geotrichum candidum* e os gêneros de leveduras *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Torulaspota* e *Kluyveromyces*. Quanto às características físico-químicas, os valores de percentual de umidade e cloreto de sódio não apresentaram diferença estatística entre as amostras. Já o percentual de gorduras foi maior na amostra maturada no inverno/seco e o pH na amostra do verão/úmido. A partir destes resultados foi possível conhecer os fungos presentes na superfície do queijo e observar que nas diferentes estações do ano existe uma variação na microbiota e suas características.

**Palavras-chave:** queijos artesanais. leite cru. diversidade. microbiota *terroir*.

## 1 INTRODUÇÃO

A região do Serro, localizada no Vale do Jequitinhonha, região da Serra do Espinhaço, no estado de Minas Gerais, é caracterizada por ricas tradições e valores culturais (NUNES; DE MELO, 2013). O Queijo Minas Artesanal (QMA) do Serro é um alimento tradicional produzido na região com leite de vaca cru com rica conotação social, cultural e econômica além de possuir Indicação Geográfica reconhecida pelo Instituto Nacional de Proteção Industrial (INPI) (BORELLI, et al. 2006). Ele apresenta variações em relação aos queijos semi-duros devido ao sabor típico, pronunciadamente ácido (CARDOSO, et al. 2015). Por ser um alimento produzido de forma artesanal e sem a aplicação de tratamentos térmicos, observa-se a possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos (MONTEL, et al. 2014).

A microbiota do leite cru é uma parte importante da microbiota dos queijos tradicionais. Entretanto, poucos dados existem sobre a maneira pela qual a diversidade de leveduras pode mudar devido a variações sazonais, por exemplo. Uma grande diversidade microbiana, aliada a métodos específicos de fabricação de queijos, como os métodos tradicionais, é a chave para permitir que os queijos tradicionais desenvolvam suas características particulares, incluindo menor risco de micro-organismos patogênicos e variação de características sensoriais. (KUPIEC; REVELL, 1998; MONTEL, et al. 2014; CARDOSO, et al. 2015).

Queijos maturados e com fungos podem ser encontrados em todo o mundo, sendo os principais produtos em muitos países. O processamento tradicional é caracterizado por períodos de maturação sob condições naturais não controladas, onde os fungos podem crescer na superfície do queijo durante todo o processo de maturação. Os fungos que crescem nestes queijos podem contribuir para o seu sabor por meio de atividades enzimáticas como lipólise e proteólise e atividades oxidativas (DELGADO, et al. 2016).

Ainda sabe-se pouco sobre o perfil micológico do QMA característico do *terroir* da região produtora. É importante para todos os envolvidos na cadeia de produção, desde o produtor até o consumidor, conhecer a diversidade destes micro-organismos no produto. Tal conhecimento poderia possibilitar melhorias em todas as etapas de fabricação e capacitação dos produtores priorizando a qualidade, segurança microbiológica e, conseqüentemente, a ampliação do comércio.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi determinar a diversidade da microbiota *terroir* (fungos filamentosos e leveduras) que se desenvolve na superfície do Queijo Minas

Artesanal produzido na microrregião do Serro, bem como das características físico-químicas do produto em diferentes condições de clima e umidade (verão/úmido e inverno/seco).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

As amostras foram coletadas em queijaria produtora certificada, localizada no município do Serro, região da Serra do Espinhaço, no estado de Minas Gerais, Brasil.

Foram coletadas seis amostras de QMA, maturados entre 45 e 60 dias (Figura 1), sendo três amostras do período de verão chuvoso e quente (março) e três amostras com o mesmo tempo de maturação do período de inverno seco e frio (julho) no ano de 2016 (Tabela 1).

As amostras foram embaladas (embalagem própria), armazenadas em sacos estéreis e transportadas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, onde foram posteriormente analisadas.

Figura 1 Amostra de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro



Fonte: Autora (2016)

Tabela 1 Amostras de Queijo Minas Artesanal coletadas na microrregião do Serro

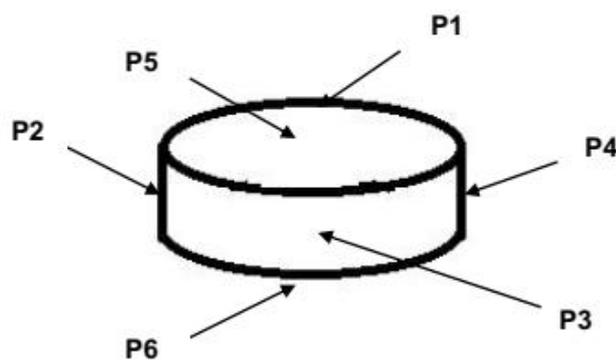
Amostras	Local	Período	Estação/Clima	Tempo de maturação	Coordenadas geográficas		
					Latitude	Longitude	Altitude
Amostra 1	Serro – MG	março 2016	Verão/Úmido	45-60 dias	18° 38' 19.7628" S	43° 23' 2.7384" W	812 m
Amostra 2	Serro – MG	julho 2016	Inverno/Seco	45-60 dias	18° 38' 19.7628" S	43° 23' 2.7384" W	812 m

Fonte: Autora (2018)

## 2.2 Avaliação da microbiota por método dependente de cultivo

Foram realizados dois métodos para o isolamento de fungos filamentosos e leveduras das amostras de QMA. O primeiro consistiu no repique direto da casca do queijo para meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MA) (extrato de malte: 20 g; ágar: 20 g; água destilada: 1 L). O segundo se deu pela técnica de diluição seriada. Para realização da técnica, utilizou-se 25 g de casca de queijo triturada grosseiramente, obtidas de 4 pontos equidistantes da lateral (P1, P2, P3 e P4), 1 ponto central da base e outro da superfície (P5 e P6), conforme a Figura 2. À casca triturada foram adicionados 225 mL de água peptonada com concentração de 0,1%. A solução foi acondicionada em saco estéril e levada para agitação em Stomacker, onde foi submetida a 490 golpes/2 minutos. Em seguida procedeu-se com a diluição seriada e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram espalhadas na superfície dos meios de cultura e incubadas em BOD a 25 °C por 5 a 7 dias. Os meios de cultura utilizados foram Ágar Dichloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (glicose: 10,0 g; peptona bacteriológica: 5,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,5 g; solução de rosa de bengala a 5%: 0,5 mL; dicloran: 1,0 mL; água destilada: 1 L; ágar: 15,0 g; cloranfenicol: 1 mg) e Dichloran Glicerol Medium Base (DG18) (dicloran: 1,0 mL; peptona bacteriológica: 5,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,5 g; glicerol: 220 g; ágar: 15,0g; cloranfenicol: 1 mg; água destilada: 1 L).

Figura 2 Modelo esquemático de preparo da amostra para técnica de diluição seriada



Fonte: Autora (2018)

Após o período de incubação foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e empregada a técnica de raiz quadrada para determinar o total de fungos filamentosos e leveduras que seriam isolados. Em seguida, os isolados foram transferidos para meio de purificação MA e incubados em BOD 25 °C por 7 dias (fungos filamentosos) e 28 °C

por 48 horas (leveduras). Após a obtenção das colônias puras os isolados foram preservados e iniciou-se o processo de identificação.

### 2.3 Preservação dos isolados

Os fungos filamentosos identificados foram preservados em duplicata por dois métodos distintos. Por meio de coleta dos esporos, com auxílio de papel filtro em tubos Eppendorf, preservados à temperatura de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, como método principal de preservação, a técnica de criopreservação a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As leveduras identificadas foram armazenadas em duplicata em tubos Eppendorf, preservados pela técnica de criopreservação a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Primeiramente foram adicionados 0,5 mL de caldo YEPG em tubos Eppendorf. Em seguida a levedura foi repicada com o auxílio de uma alça de platina no caldo nutriente e incubada em BOD a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 horas ou até turvação do meio. Posteriormente, foram adicionado 0,5 mL de solução de glicerol a 40% e armazenada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Outro método utilizado para preservação das leveduras foi o repique direto para uma solução crioprotetora de glicerol a 20%.

Os isolados após a identificação serão depositados na Coleção de Cultura de Microorganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) da Universidade Federal de Lavras.

### 2.4 Identificação de fungos filamentosos

O método de identificação utilizado depende do gênero de fungo filamentoso encontrado, sendo utilizado para as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, o Manual de Klich (2002), para o gênero *Penicillium*, o Manual de Pitt (2000) e para os demais gêneros, o Manual de Samson et al. (2000). Os isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* foram crescidos em meios de cultura Ágar Czapek Levedura (CYA) [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 1,0 g; concentrado czapec: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g, ágar: 15,0 g, água destilada: 1 L; (concentrado czapec:  $\text{NaNO}_3$ : 30,0 g,  $\text{KCl}$ : 5,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 5,0 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,1 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,1 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 0,05 g, água destilada: 100 mL)] a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e Ágar Extrato de Malte e Levedura (MEA) (extrato de malte: 20,0 g, peptona bacteriológica: 1,0 g, glicose: 30,0 g, ágar: 20,0 g, água destilada: 1L) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um período de 7 dias retirou-se as características

macroscópicas e microscópicas das colônias dos fungos. Para os demais gêneros utilizou-se o meio de cultura MEA a 25 °C por 7 dias para caracterização morfológica.

## 2.5 Análises quimiotaconômica de fungos filamentosos potencialmente toxigênicos

Os fungos filamentosos isolados, identificados como potencialmente produtores de Ocratoxina A (OTA) e Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2), como as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* das Seções *Nigri*, *Circundati* e *Flavi*, bem como os potencialmente produtores de Citrinina como as espécies do gênero *Penicillium* da Seção *Citrina* foram cultivados em meio de cultura Ágar Coco (leite de coco: 400 mL; ágar: 15,0 g e água destilada: 400 mL) para verificação de produção de micotoxinas. Após incubação por 7 a 10 dias a 25 °C conforme descrito por Mohamed et al. (2013). Verificou-se a produção de micotoxinas em luz ultravioleta com  $\lambda$  366 nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER) Os isolados caracterizados como produtores foram avaliados pelo método de cromatografia de camada delgada para confirmação da produção e identificação da micotoxina (Plug Agar).

Para realização da técnica de Plug Agar, as espécies micotoxigênicas do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri* foram inoculadas em meio Ágar Czapek Levedura (CYA) [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g; concentrado czapec: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g, ágar: 15,0 g, água destilada: 1 L; (concentrado czapec: NaNO<sub>3</sub>: 30,0 g, KCl: 5,0 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 5,0 g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05 g, água destilada: 100 mL)] por 7 dias a 25 °C. Já as espécies pertencentes às Seções *Circundati*, *Flavi* e *Citrina* foram inoculadas em meio Ágar Extrato de Levedura Sacarose (YES) (extrato de levedura: 20,0 g; sacarose: 150 g; ágar: 20,0 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05 g; água destilada: 1 L), também por 7 dias a 25 °C conforme Filtenborg & Frisvad (1980).

Utilizou-se uma solução padrão de OTA, Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, Citrinina (SIGMA-ALDRICH) e a placa de cromatografia de camada delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20 x 20) com fase móvel composta por tolueno acetato de etila e ácido fórmico (TEF) 90% (60:30:10). Após a eluição e secagem das placas em capela de fluxo laminar, a verificação quanto à produção de micotoxinas foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$  366 nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de OTA, Citrinina, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 apresentaram um fator de retenção e um *spot* de fluorescência semelhante ao dos padrões utilizados.

## 2.6 Identificação das leveduras

As leveduras isoladas foram cultivadas em placas contendo o meio Yeast Extract Peptone Glucose Ágar (YEPG) (extrato de levedura 1%; peptona bacteriológica 2%; glicose 2%, ágar 1,5%) incubados a 28 °C por um período de 18 horas e identificadas por Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF). Em seguida, aproximadamente  $3 \times 10^7$  células de cada morfotipo foram transferidas para microtubos estéreis. Posteriormente, 3 µL de ácido fórmico / acetonitrila (25:75) foram adicionados a cada microtubo. Os microtubos então foram vortexados por 1 minuto e, em seguida, 1 µL da suspensão foi transferida para a placa MALDI flex target (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Após evaporação quase completa do líquido na placa, 1 µL de solução matriz foi adicionado e homogeneizado [solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) em acetonitrila a 50%; ácido trifluoroacético a 2,5%] (OLIVEIRA et al. 2015).

A cepa *Escherichia coli* K12, obtida da Micoteca da Universidade do Minho (MUM, <http://www.micoteca.deb.uminho.pt>) foi utilizada para extração *in situ* de proteínas que, por sua vez, foram usadas como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS. A cepa de *E. coli* K12 foi cultivada em meio Ágar Luria-Bertani (LB) (bactotripton, 1,0 g; extrato de bactoheyeast, 0,5 g; NaCl, 1,0 g; ágar, 15,0 g; água destilada, 1 L) a 37 °C por 18 horas. Após incubação, aproximadamente 1 µg de material celular de uma única colônia de *E. coli* K12 foi transferido para a placa MALDI flex target e a solução matriz foi adicionada e homogeneizada. Cada estirpe foi preparada em triplicata para avaliar reprodutibilidade. As amostras foram então analisadas em um MALDI-TOF microflex LT spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), usando o MALDI Biotyper 3.0 automatic system (RESENDE, et al. 2018).

## 2.7 Avaliação da microbiota por método independente de cultivo

Para realização da análise metagenômica, foram enviados 3 gramas de cada amostra de QMA devidamente congeladas para a empresa responsável pelo sequenciamento. Toda a análise foi realizada pelo Laboratório GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro – RJ, Brasil). Para manter a confiabilidade dos dados, o controle de qualidade (QC) foi realizado em cada etapa do procedimento (Figura 3). Os tópicos a seguir descrevem as etapas do protocolo utilizado.

Figura 3 Fluxograma da análise metagenômica



Fonte: Autora (2018)

### A. Extração do DNA genômico

Utilizou-se aproximadamente 500 mg das amostras para extração do DNA genômico. O DNA total do genoma das amostras foi extraído utilizando-se o método CTAB/SDS. A concentração e a pureza do DNA foram monitoradas em géis de agarose a 1%. De acordo com a concentração, o DNA foi diluído para 1 ng/μL utilizando água estéril.

### B. Geração de Amplicon

A região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal foi amplificada utilizando *primer* específico e *barcodes* para diferenciar as amostras. A região ITS é a mais utilizada para fungos, sendo a ITS2 utilizada nesta análise. Todas as reações de PCR foram realizadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs).

### C. Quantificação, qualificação e amplificação dos produtos PCR

O mesmo volume de tampão de carga 1X (contendo SYB green) foi misturado aos produtos de PCR e corrido por eletroforese em gel de agarose a 2% para detecção. Amostras com faixa principal brilhante entre 400-450 bp foram escolhidas para testes posteriores.

Os produtos de PCR foram misturados em proporções de mesma densidade. Em seguida, foram purificados com o Kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen Alemanha).

### D. Preparação e sequenciamento da biblioteca

As bibliotecas foram geradas utilizando o kit NEBNext® Ultra™ DNA Library Pre (Illumina, USA) e os códigos de índice foram adicionados seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade da biblioteca foi avaliada no Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, USA) e sistema Agilent Bioanalyzer 2100 (Santa Clara, USA). Por fim, a

biblioteca foi sequenciada em uma plataforma Illumina e *paired-end reads* de 250 pb foram gerados.

### **E. Análise dos dados (bioinformática)**

As *paired-end reads* foram atribuídas a amostras com base no seu *barcode* que foi retirado juntamente com a sequência do *primer*. Estas foram emparelhadas usando o *software* FLASH 1.2.7, que mesclou os pares para identificar as sobreposições geradas a partir da extremidade oposta do mesmo fragmento de DNA, a fim de reconstruir a região ITS. Os fragmentos pareados foram filtrados pelo *software* QIIME 1.7.0 para obtenção dos fragmentos de melhor qualidade. Em seguida, os fragmentos foram comparados ao banco de dados de referência (Gold Database) utilizando-se o algoritmo UCHIME (UCHIME Algorithm) para detectar sequências de quimera que foram posteriormente removidas.

A análise das sequências foi realizada pelo *software* Uparse 7.0.1001. Sequências com similaridade de 97% foram atribuídas às mesmas UTOs (Unidade Taxonômica Operacional), cuja sequência representativa foi rastreada para anotação. Para cada sequência representativa o banco de dados UNITE foi usado com base no algoritmo BLAST para anotar as informações taxonômicas.

A fim de determinar a relação filogenética de diferentes UTOs e a diferença entre as espécies dominantes em diferentes amostras/grupos, foi realizado o alinhamento de múltiplas sequências usando o *software* MUSCLE 3.8.31.

As informações de abundância das UTOs foram normalizadas usando um padrão de número de sequência correspondente à amostra com as menores sequências. As análises subsequentes de  $\alpha$  e  $\beta$  diversidade foram realizadas com base nesses dados normalizados de saída. A análise de  $\alpha$  diversidade avalia a complexidade da diversidade de espécies para uma amostra. Já a análise de  $\beta$  diversidade é utilizada para avaliar diferenças de amostras em complexidade de espécies.

## **2.8 Análises físico-químicas**

As amostras de QMA foram submetidas às análises físico-química em três repetições para determinação dos teores de umidade, gorduras e cloreto de sódio além de pH. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Leite e Produtos Lácteos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras de acordo com os procedimentos

da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006) e da Instrução Normativa N° 68, de 12 de dezembro de 2006, que define os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. (BRASIL, 2006)

### **2.8.1 Umidade**

A determinação do percentual de umidade se deu por secagem da amostra em estufa a  $102 \pm 2$  °C. Após secagem, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente em dessecador até obtenção de massa constante.

### **2.8.2 Cloreto de Sódio**

O teor de cloreto de sódio foi obtido por meio do método argentométrico de Mohr, baseado na titulação do cloreto de sódio com nitrato de prata em presença de cromato de potássio como indicador.

### **2.8.3 pH**

Os valores de pH foram determinados por análise em medidor de pH.

### **2.8.4 Gorduras**

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

## **2.9 Análise estatística**

Para avaliar a diferença estatística entre as amostras nas análises físico-químicas realizadas, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com posterior teste de Tukey utilizando o *software* Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

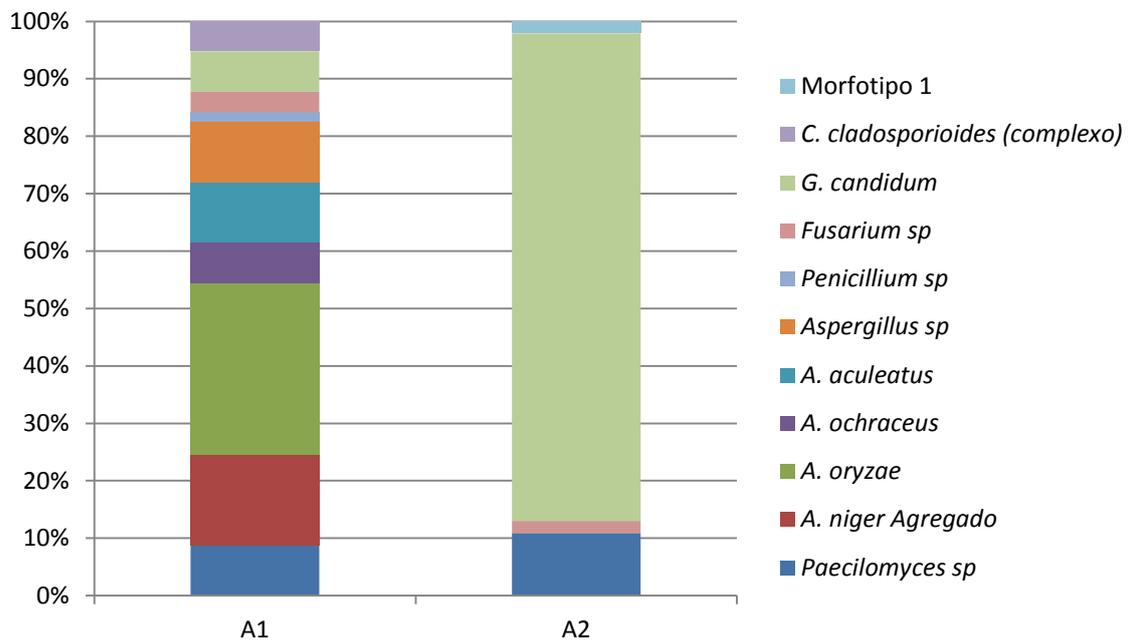
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Microbiota avaliada pelo método dependente de cultivo

##### 3.1.1 Fungos filamentosos

Referente à amostra A1 de QMA maturado no período de verão/úmido, identificou-se 57 isolados de fungos filamentosos e, referente à amostra A2, de QMA maturado no período de inverno/seco, identificou-se 46 fungos filamentosos. As populações médias totais de fungos filamentosos e leveduras na amostra A1 foram  $20,9 \times 10^5$  UFC/g no meio de cultura DRBC e  $37,5 \times 10^5$  UFC/g no meio de cultura DG18. Para a amostra A2, as populações médias totais foram  $26,8 \times 10^3$  UFC/g no meio de cultura DRBC e  $20 \times 10^3$  UFC/g no meio de cultura DG18. As espécies identificadas estão dispostas no Gráfico 1 de acordo com a porcentagem de cada espécie presentes nas amostras.

Gráfico 1 Frequência de ocorrência de espécies de fungos filamentosos presentes nas amostras A1 e A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro



Fonte: Autora (2018)

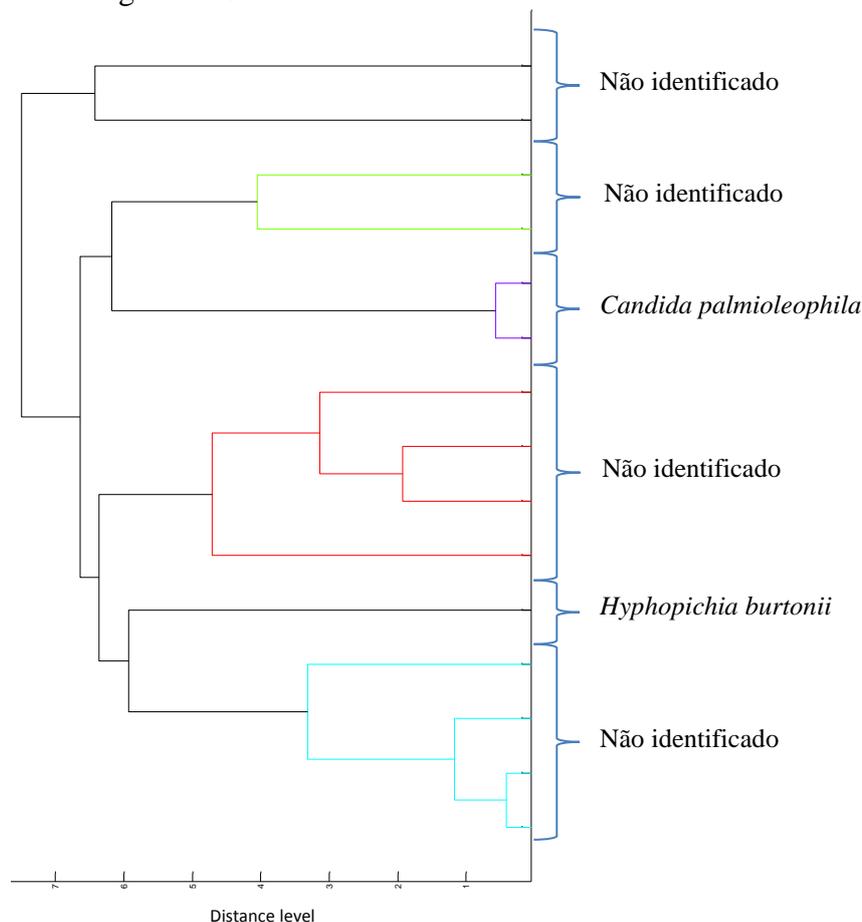
Na A1 foram identificados os fungos filamentosos *Paecilomyces* sp (8,77%), *Aspergillus niger* Agregado (15,8%), *A. oryzae* (29,8%), *A. ochraceus* (7%), *A. aculeatus* (10,5%), *Aspergillus* sp (10,5%), *Penicillium* sp (1,75%), *Fusarium* sp (3,5%), *Geotrichum candidum* (7%) e espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* (5,2%). Esta amostra

também apresentou maior população média total. Já na A2 estiveram presentes *Paecilomyces* sp (10,9%), *Fusarium* sp (2,1%), *Geotrichum candidum* (84,8%) e morfotipo 1 não identificado (2,1%). Nenhum dos isolados identificados como potencialmente toxigênicos, produtores de Ocratoxina A como *Aspergillus niger* Agregado e *A. ochraceus*, foram produtores de toxina.

### 3.1.2 Leveduras

Um total de 15 leveduras foram isoladas da amostra A1, referente ao QMA maturado no período de verão/úmido e 7 leveduras da A2 referente ao QMA maturado no período de inverno/seco. As Figuras 4 e 5 mostram o dendograma realizado a partir do perfil proteico obtido no MALDI-TOF de leveduras isoladas da amostra A1 e da amostra A2 respectivamente.

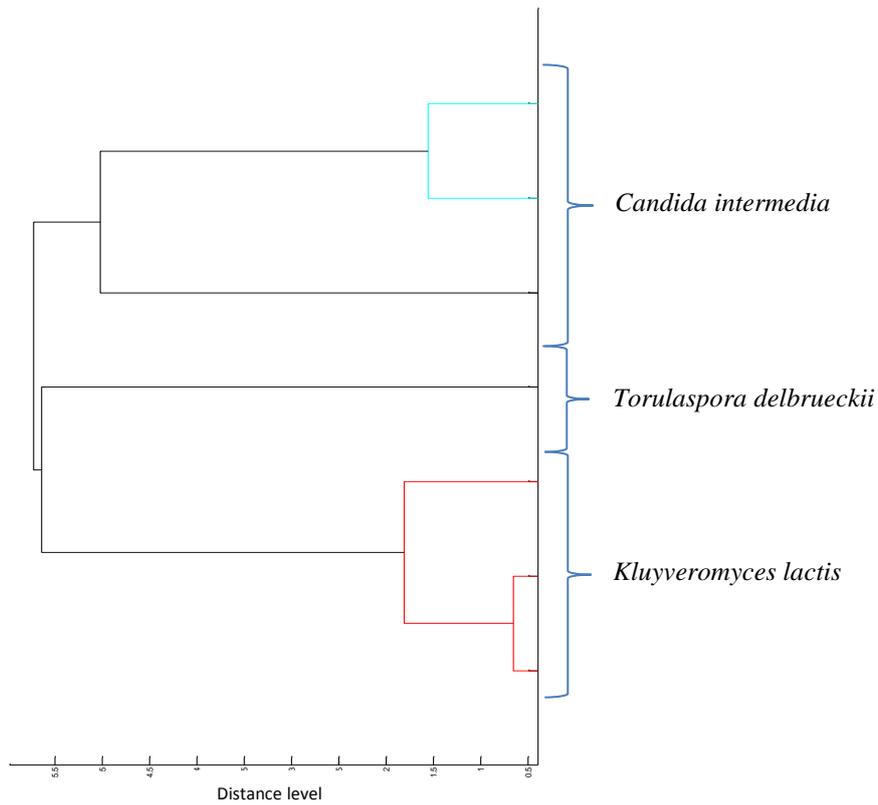
Figura 4 Dendograma das leveduras isoladas da amostra A1 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro



Fonte: Autora (2018)

Das 15 leveduras da amostra A1 de QMA maturado no período de verão/úmido, 80% não foram identificadas. O restante dos isolados dividiu-se entre as espécies *Candida palmioleophila* (13,33%) e *Hyphopichia burtonii* (6,66%).

Figura 5 Dendograma das leveduras isoladas da amostra A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro

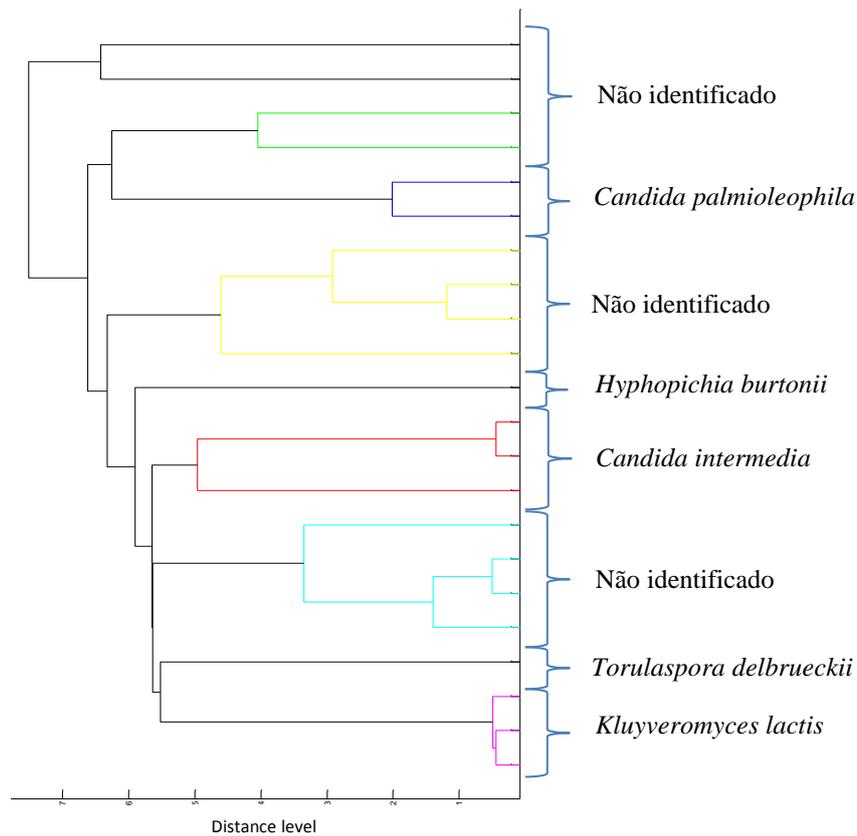


Fonte: Autora (2018)

Todas as leveduras da amostra A2 de QMA maturado no período de inverno/seco foram identificadas, sendo que ambas as espécies *Candida intermedia* e *Kluyveromyces lactis* representaram 42,8%. *Torulaspora delbrueckii* representou 14,3% dos isolados avaliados.

A Figura 6 mostra o dendograma das leveduras isoladas de ambas amostras (A1 e A2) de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro, demonstrando a diversidade de leveduras da região.

Figura 6 Dendograma das leveduras isoladas das amostras A1 e A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro



Fonte: Autora (2018)

Através do dendograma, é possível observar uma maior ocorrência das espécies *Candida intermedia* e *Kluyveromyces lactis* (13,6%), *Candida palmioleophila* (9%). Como menos ocorrentes, observou-se *Hyphopichia burtonii* e *Torulaspora delbrueckii* (4,54%).

### 3.2 Análises físico-químicas

Na Tabela 2 observam-se as características físico-químicas analisadas das Amostras 1 (A1) de QMA maturado no verão/úmido e Amostra 2 (A2) de QMA maturado no inverno/seco.

Tabela 2 Composição físico-química das amostras A1 e A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro

Amostra	Aspectos físico-químicos			
	% Umidade	% Gorduras	% NaCl	pH
<b>A1</b>	27,562 ± 1,4 a	38 ± 0 a	0,91 ± 0,03 b	5,53 ± 0,01 a
<b>A2</b>	29,653 ± 0,96 a	40 ± 0 b	0,93 ± 0,03 b	5,48 ± 0,005 b

\*Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$ .

Fonte: Autora (2018)

A avaliação do teor de umidade mostrou o menor valor na amostra A1 (27,562%) e maior na amostra A2 com 29,653% de umidade. Ambas as amostras foram estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) neste aspecto.

O teor de gorduras analisado mostrou que as amostras diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ). O menor valor (38%) foi encontrado na amostra A1 e maior valor na amostra A2 (40%). A partir destes valores (gorduras e umidade) foi possível obter o percentual de gorduras no extrato seco (GES): 52,4% para amostra A1 e 56,8% para amostra A2.

Outro aspecto que não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as amostras analisadas de QMA da microrregião do Serro foi o percentual de NaCl. Os valores variaram de 0,91% (amostra A1) e 0,93% (amostras A2).

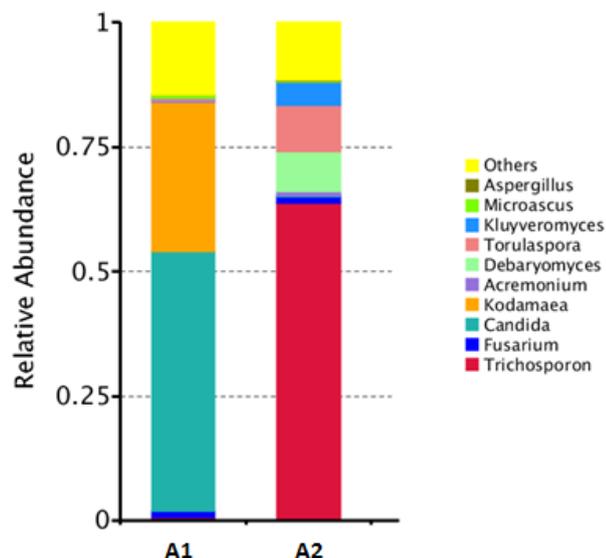
Para os valores de pH, as amostras A1 e A2 foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) mostrando valores de 5,53 e 5,48 respectivamente.

### 3.3 Microbiota avaliada pelo método independente de cultivo

A partir do estudo metagenômico das amostras, um total de 256 UTOs, contendo 39 gêneros e 42 espécies, foram observadas na amostra A1. Na amostra A2 encontrou-se 259 UTOs contendo 41 gêneros e 46 espécies.

O Gráfico 2 mostra a abundância relativa dos gêneros de fungos filamentosos e leveduras encontrados nas amostras A1 (QMA maturado no verão/úmido) e A2 (QMA maturado no inverno/seco) da microrregião do Serro.

Gráfico 2 Abundância relativa de gêneros encontrados nas amostras A1 e A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro



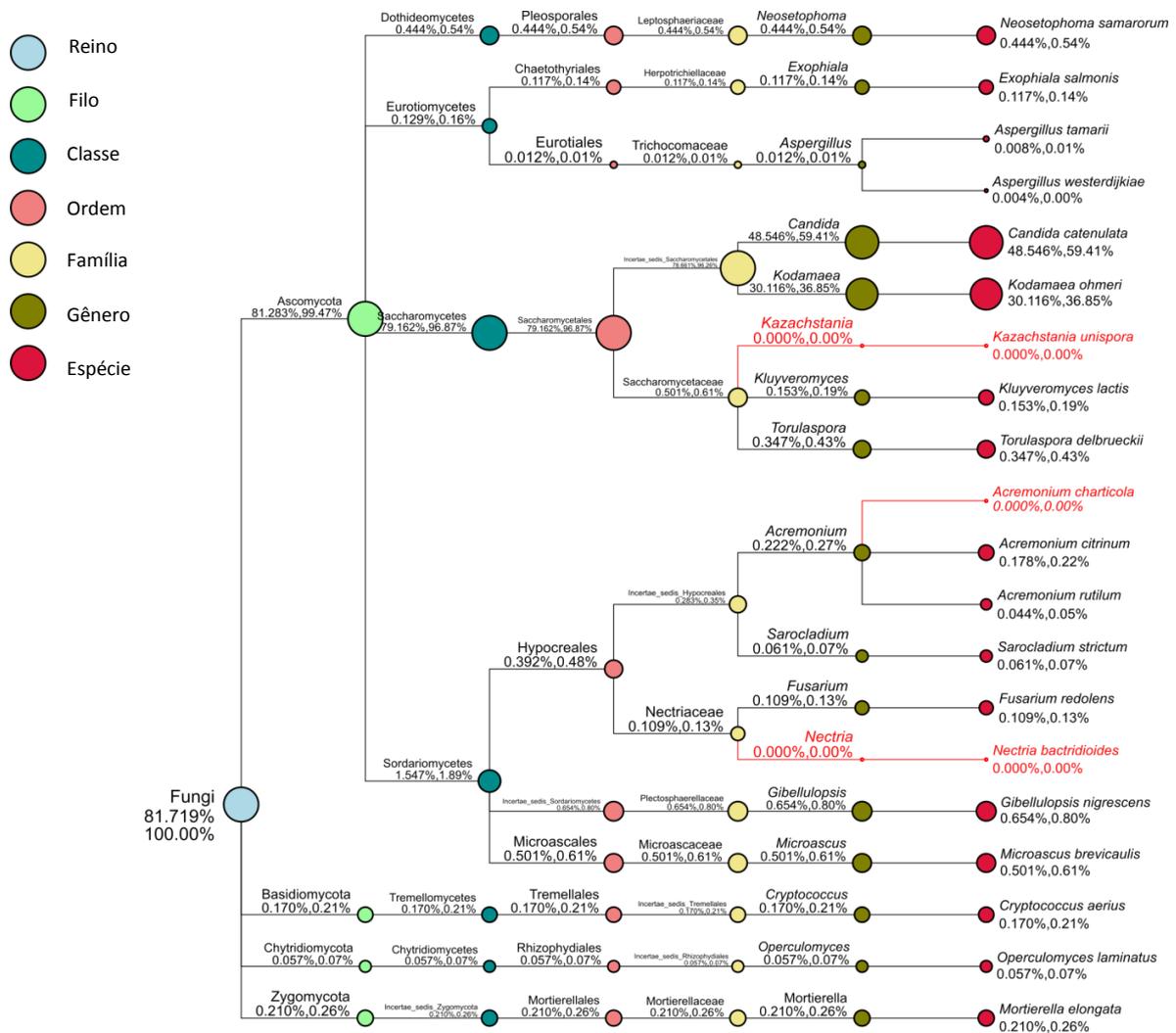
Fonte: Autora (2018)

Os resultados revelam que na amostra A1, de QMA maturado no período de verão/úmido, houve uma maior prevalência de leveduras do gênero *Candida*, *Kodamaea*, *Torulaspora* e *Trichosporon* e dos fungos filamentosos *Fusarium*, *Microascus*, *Acremonium*. Outros gêneros identificados em menor prevalência foram *Debaromyces*, *Kluveromyces*, *Aspergillus*, *Gibellulopsis*, *Neosetophoma*, *Nectria*, *Cryptococcus*, *Exophiala*, *Mortierella*, *Trichoderma*, *Minimedusa*, *Microdochium*, *Sarocladium*, *Gibberella*, *Dendryphion*, *Operculomyces*, *Veronaea*, *Thelebolus*, *Rhizophlyctis*, *Metarhizium*, *Cladorrhinum*, *Tetragoniomyces*, *Scutellinia*, *Mucor*, *Pseudogymnoascus*, *Tetracladium*, *Phaeoectriella*, *Monographella*, *Saccharmyces*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Emericellopsis* (ANEXO).

Na amostra A2, de QMA maturado no período de inverno/seco, houve uma maior prevalência de leveduras do gênero *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Torulaspota* e *Kluyveromyces*, seguidos dos gêneros de fungos filamentosos *Aspergillus*, *Fusarium* e *Acremonium*. Outros gêneros identificados em menor prevalência foram *Atractiella*, *Rhizopus*, *Septoriella*, *Mucor*, *Kazachstania*, *Gibellulopsis*, *Neosetophoma*, *Nectria*, *Cryptococcus*, *Exophiala*, *Mortierella*, *Trichoderma*, *Minimedusa*, *Microdochium*, *Sarocladium*, *Gibberella*, *Dendryphion*, *Operculomyces*, *Veronaea*, *Thelebolus*, *Rhizophlyctis*, *Metarhizium*, *Cladorrhinum*, *Tetragoniomyces*, *Scutellinia*, *Mucor*, *Pseudogymnoascus*, *Tetracladium*, *Phaeonectriella*, *Monographella*, *Saccharmyces*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Emericellopsis* (ANEXO).

Na Figura 7 se observa a diversidade de espécies mais frequentes de fungos filamentosos e leveduras, identificados pela análise metagenômica e presentes na amostra A1, analisada de QMA maturado no período de verão/úmido da microrregião do Serro.

Figura 7 Diversidade de espécies de fungos filamentosos e leveduras da amostra A1 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro



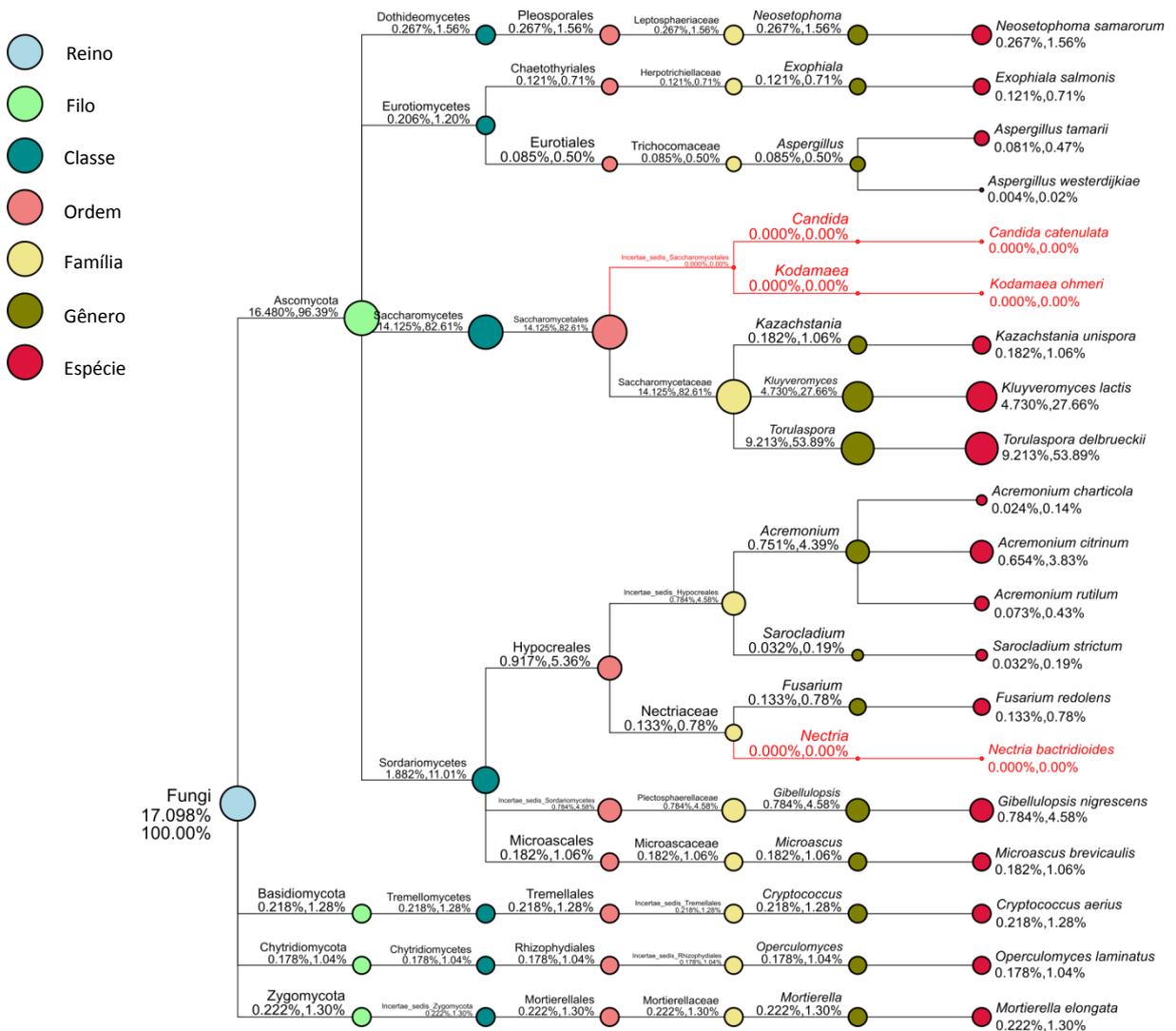
Fonte: Autora (2018)

*Candida catenulata* e *Kodamaea ohmeri* foram as espécies mais frequentes na amostra A1 representando 59,41% e 36,85% respectivamente. Outras espécies identificadas nesta amostra foram *Gibellulopsis nigrescens*, *Microascus brevicaulis*, *Neosetophoma samarorum*, *Exophiala salmonis*, *Aspergillus tamaris*, *A. westerdijkiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Acremonium citrinum*, *A. rutilum*, *Sarocladium strictum*, *Fusarium redolens*, *Cryptococcus aerius*, *Operculomyces laminatus* e *Mortierella elongata*, totalizando 3,73%. Espécies muito pouco prevalentes também identificadas nesta amostra foram *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Candida etchellsii*, *Acremonium persicinum*, *Nectria bactridioides*, *Cryptococcus terricola*, *Mortierella exigua*, *Trichoderma piluliferum*, *Minimedusa polyspora*, *Microdochium bolleyi*, *Gibberella intricans*, *Dendryphon nanum*,

*Veronea musae*, *Thelebolus ellipsoideus*, *Rhizophlyctis rosea*, *Metarhizium carneum*, *Cladorrhinum foecundissimum*, *Tetragoniomyces uliginosus*, *Scutellinia crucipila*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Tetracladium furcatum*, *Phaeoectriella lignicola*, *Monographella nivalis*, *Trichosporon dulcitum* e *Saccharomyces cerevisiae* (ANEXO).

Na Figura 8 se observa a diversidade de espécies mais frequentes de fungos filamentosos e leveduras, identificados pela análise metagenômica, presentes na amostra A2, analisada de QMA maturado no período de inverno/seco da microrregião do Serro.

Figura 8 Diversidade de espécies de fungos filamentosos e leveduras da amostra A2 de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro



Fonte: Autora (2018)

Dentre as principais espécies presentes na amostra A2 observa-se *Torulaspora delbrueckii* e *Kluveromyces lactis* com 53,89% e 27,66% respectivamente. Outras espécies

identificadas nesta amostra foram *Kazachstania unispora*, *Gibellulopsis nigrescens*, *Microascus brevicaulis*, *Neosetophoma samarorum*, *Exophiala salmonis*, *Aspergillus tamarisii*, *A. westerdijkiae*, *Acremonium citrinum*, *A. charticola*, *A. rutilum*, *Sarocladium strictum*, *Fusarium redolens*, *Cryptococcus aerius*, *Operculomyces laminatus* e *Mortierella enlongata*, totalizando 18,45%. Espécies muito pouco prevalentes também identificadas nesta amostra foram *Septoriella oudemansii*, *Rhizopus arrhizus*, *Atractiella solani*, *Mucor hiemallis*, *Candida parapsilopsis*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Candida etchelsii*, *Nectria bactridioides*, *Cryptococcus terricola*, *Mortierella exigua*, *Trichoderma piluliferum*, *Minimedusa polyspora*, *Microdochium bolleyi*, *Gibberella intricans*, *Dendryphion nanum*, *Veronaea musae*, *Thelebolus ellipsoideus*, *Rhizophlyctis rosea*, *Metarhizium carneum*, *Cladorrhinum foecundissimum*, *Tetragoniomyces uliginosus*, *Scutellinia crucipila*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Tetracladium furcatum*, *Phaeonectriella lignicola*, *Monographella nivalis*, *Trichosporon dulciturum* e *Saccharomyces cerevisiae* (ANEXO).

## 4 DISCUSSÃO

Por meio de técnicas de identificação dependentes de cultivo, foi possível perceber uma maior diversidade e população média total de fungos filamentosos presentes na amostra A1 de QMA maturado no período de verão/úmido, em relação à amostra A2 de QMA maturado no período de inverno/seco. Com temperatura média da região em torno dos 20 °C, a maturação do queijo no ambiente das queijarias ocorre numa faixa favorável de crescimento para fungos filamentosos e leveduras (MONNET, et al. 2014). Nilsen et al. (2004), após analisar o crescimento de fungos em madeiras utilizadas em construções, perceberam que a umidade relativa mínima para crescimento dos fungos foi de 78% ( $\pm 2-3\%$ ). Considerando-se a umidade relativa média da região do Serro no período de verão a 81,2% e no período de inverno a 71,8%, percebe-se que isto poderia propiciar o aumento do crescimento de fungos filamentosos no período do verão (FIGUEIREDO, 2014). A temperatura média da região nos meses quentes e chuvosos, mais próxima de 25 °C, também favorece um maior crescimento de fungos.

Outra técnica utilizada neste trabalho foi a análise metagenômica das amostras de QMA. Esta análise tem sido amplamente utilizada para explorar amostras ambientais com o objetivo de traçar um panorama da diversidade microbiana presente no ambiente, bem como entender e ampliar o conhecimento destes ecossistemas. Avalia-se que a grande parte dos micro-organismos presentes nestes ambientes não seja cultivável, devido a diversos fatores, impossibilitando a reprodução do habitat em laboratório. De fato, essa abordagem é relativamente rápida e oferece a perspectiva de detectar uma diversidade maior de espécies do que a aplicação de métodos usando os meios de cultura clássicos (MERING, et al. 2007; ŠURANSKÁ, et al. 2016). A metagenômica utiliza o DNA presente na amostra, estando esse viável para o cultivo ou não, para comparação no banco de dados. Isso pode justificar a diferença entre os resultados encontrados nas análises realizadas para identificação dos micro-organismos. Sendo assim, fica clara a importância de uma associação de técnicas para o estudo da diversidade, visto que o isolamento e a identificação a partir do método dependente de cultivo permite a preservação dos isolados para estudos posteriores.

Segundo Rasime, et al. (2005) algumas das espécies como as pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium* e do complexo *Cladosporium cladosporioides*, como as encontradas na amostra A1 e na amostra A2 (*Fusarium* sp e *Paecilomyces* sp), são fungos filamentosos típicos de solo comumente encontrados em queijos maturados em ambientes como o de caverna. As estirpes de *Geotrichum candidum*

(predominante da amostra A2) não só fazem parte da microbiota do leite cru, como também são encontradas em ambientes diversos como o solo, ervas e silagem. *G. candidum* também pode atuar inibindo o crescimento do fungo filamentoso *Mucor* sp, cujas hifas aéreas são responsáveis pelo defeito de queijo *poil de chat* (pelo de gato), além de inibir a esporulação de certas cepas do fungo filamentoso micotoxigênico *Aspergillus flavus* e espécies indesejáveis de *Penicillium*, como *P. commune* e *P. caseifulvum*. A espécie *Aspergillus tamarii* também já foi isolada de queijo maturado (PHILIPPE, et al. 2012; MARCELLINO; BENSON, 2014).

Lavoie, et al. (2012) observaram que em queijos fabricados a partir de leite cru, na província de Quebec, na Canadá, comumente encontram-se os gêneros *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Fusarium*. Flórez e colaboradores (2007) encontraram por meio de técnicas morfológicas e moleculares em queijo Cabrales, um tradicional queijo azul espanhol fabricado com leite cru, diferentes cepas de *Penicillium* sp e *Geotrichum candidum*. El-Fadaly, et al. (2015) após analisar amostras de queijo Romy, um tradicional queijo duro artesanal egípcio fabricado a partir de leite de vaca ou leite misto de vaca e búfala, identificaram morfológicamente as espécies *Geotrichum candidum*, *Aspergillus ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. nidulans*, *Emericella nidulans*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. flavipes*, *Penicillium* sp, *Mucor* sp e *Rhizopus stolonifer*.

Jodral, et al. (1993) avaliaram fungos filamentosos de leite cru da Espanha e identificaram como mais frequentes os gêneros *Geotrichum* (76,5%), *Fusarium* (45,3%) e *Aspergillus* (31,2%). Vacheyrou et al. (2011) concluíram que a maioria das espécies de fungos filamentosos encontradas no leite de vaca se origina de uma transferência do estábulo para o campo de ordenha e depois para o leite. Os fungos filamentosos que ocorrem no leite cru ou no ambiente da queijaria não são muito susceptíveis de persistir e/ou crescer no queijo devido à composição bioquímica do queijo e ao efeito de obstáculo exercido pela microbiota do queijo. Estes estudos corroboram os resultados encontrados neste trabalho e reforçam a influência do ambiente na fabricação artesanal, visto que a maioria desses não são microorganismos relacionados diretamente ao leite, vindo a aparecer no queijo durante o período de maturação. O crescimento descontrolado de fungos na superfície de queijos deve ser visto com atenção, sendo importante a seleção de estirpes não toxigênicas, que tragam benefícios e garantam a segurança microbiológica do produto.

Entre as amostra A1 e A2 houve uma diferença na quantidade de leveduras isoladas, visto que, na amostra A2 o microrganismo que prevaleceu foi *G. candidum*. Microrganismo este que apresenta comportamento semelhante ao de levedura. Cardoso, et al. (2015), após avaliar amostras de QMA do Serro maturadas nos períodos secos e chuvosos, constatou que a

diversidade de espécies de leveduras encontradas no QMA do Serro não é influenciada pelas estações do ano, mas sim pela duração do período de maturação. Após o décimo quinto dia de maturação, as populações permaneceriam inalteradas. Considerando-se que as amostras analisadas neste trabalho de ambas as estações tinham o mesmo tempo de maturação (45 a 60 dias), observou-se uma diferença entre a diversidade e população de leveduras encontradas, estando estas mais diversificadas e populosas no queijo maturado no inverno. As temperaturas mais baixas bem como a umidade relativa do ar podem dificultar o crescimento dos fungos filamentosos no queijo.

De acordo com a avaliação de Cardoso, et al. (2015) as leveduras encontradas em maior quantidade nas amostras de QMA do Serro foram *Debaryomyces hansenii*, *Kodamaea ohmeri* e *Kluyveromyces marxianus*. Sendo que, somente no período chuvoso foram encontradas as espécies *Candida* sp, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Galactomyces candidum* (= *Geotrichum candidum*) e *Rhodotorula mucilaginosa*; e somente no período seco encontrou-se *Candida atlantica*, *Candida intermedia*, *Candida phangngensis* e *Candida silvae*. Entretanto, no trabalho presente, *G. candidum* prevaleceu na amostra de QMA maturado no período de inverno/seco. Outros isolados foram encontrados em ambas as estações por Cardoso et al. (2015). Foram encontrados neste trabalho foram *Kluyveromyces lactis* e *Torulaspora delbrueckii*, ambas mais prevalentes na amostra A2 de queijo maturado no inverno/seco.

Nobrega, et al. (2008) após analisarem a composição leveduriforme do pingo utilizado para produção do QMA da Serra da Canastra no período das águas e no período da seca, identificaram *D. hansenii*, *T. delbrueckii* e *K. lactis* e no período das águas a espécie que se distinguiu foi *K. marxianus*. As espécies encontradas neste trabalho diferiram tanto entre os períodos quanto na frequência com que ocorreram. Uma importante levedura identificada (prevalente na amostra A2) que pode contribuir com a qualidade do queijo é *Kluyveromyces lactis*, pois apresenta propriedades probióticas e tecnológicas, podendo ser usadas como culturas adjuntas para contribuir com as propriedades funcionais relacionadas à qualidade e à saúde dos produtos lácteos (FADDA, et al. 2017).

Borelli, et al. (2006) avaliaram a população de leveduras em QMA da Serra da Canastra e identificaram como mais prevalentes *C. catenulata*, *D. hansenii* e *T. delbrueckii*. Dentre as leveduras identificadas na amostra A1, constatou-se que a espécie *C. catenulata* provavelmente desempenha um papel importante na microbiota natural deste queijo. Esta espécie já foi isolada de diferentes queijos produzidos em outros países (CORSETTI; ROSSI & GOBETTI, 2001). *D. hansenii*, espécie pertencente ao gênero identificado

*Debaryomyces*, presente na amostra A2, apresentou capacidade de adsorção de micotoxinas e de inibição da biossíntese de OTA por *Aspergillus westerdijkiae*, espécie que também foi encontrada na amostra A2 (GIL-SERNA, et al. 2011).

Além de contribuir com a qualidade sensorial do queijo, algumas espécies de leveduras detectadas podem contribuir com a segurança por meio dos efeitos inibitórios contra algumas espécies bacterianas patogênicas, como a levedura *C. intermédia*, identificada neste trabalho e que apresenta ação contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Younis, et al. (2017). Outras importantes leveduras identificadas foram *K. lactis*, *T. delbrueckii* e *Candida intermedia*, que mostraram-se importantes para agregar sabor e aroma ao queijo, devido a produção de compostos aromáticos voláteis (Andrade et al. (2017). Embora muitos isolados selecionados não puderam ser identificados por limitações do banco de dados ou da metodologia utilizada para identificação, duas leveduras diferentes das encontradas por Cardoso et al. (2015) e Andrade et al. (2017) foram identificadas: *Hyphopichia burtonii* e *Candida palmioleophila*.

Simoncini e colaboradores (2007), que caracterizaram a população de leveduras presentes em presuntos de Parma durante o período de maturação, identificaram a levedura *Hyphopichia burtonii* (3%). Esta levedura, geralmente encontrada em pães, cereais e alimentos fermentados, apresentou atividade inibitória contra a germinação de esporos dos fungos filamentosos micotoxigênicos *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum* e a produção de ocratoxina A pelos mesmos (VIRGILI, et al. 2012). Em contrapartida, em estudo realizado por Cuero, Smith, & Lacey (1987) para avaliar a produção de Aflatoxinas por *A. flavus* e seu crescimento em cultura dupla com cepas selvagens de *H. burtonii* sob condições controladas, concluiu-se que a levedura estimulou tanto o crescimento do fungo filamentoso quanto a produção de toxina.

De acordo com Pfliegler, Pusztahelyi & Pócsi (2015), algumas leveduras podem atuar como agentes de biocontrole, inibindo o crescimento de fungos filamentosos e, também são capazes de degradar toxinas para substâncias menos tóxicas ou mesmo não tóxicas. Entretanto, as leveduras e suas enzimas importantes biotecnologicamente podem exibir sensibilidade a certas micotoxinas, criando assim um problema considerável para a indústria.

Estes resultados mostram a importância da exploração do potencial biotecnológico das leveduras presentes no QMA, responsáveis pela agregação de características sensoriais desejáveis. A simbiose entre a microbiota é de grande importância e precisa ser mais bem investigada.

Viljoen; Khoury & Hattingh, (2003) após analisar frequência e a diversidade sazonal das ocorrências de leveduras em queijaria, constataram diferenças substanciais no número de leveduras presentes durante a maturação dos queijos no inverno e no verão. No inverno, as leveduras tenderam a aumentar constantemente durante a maturação. Entretanto, contagens semelhantes de leveduras foram obtidas de amostras ambientais durante o inverno e o verão. Variações podem ocorrer devido a vários fatores, como a concentração de sal na salmoura, temperatura do ambiente ou padrões de higiene durante a fabricação. Conseqüentemente, os números de leveduras presentes podem variar entre queijarias e mesmo entre dias consecutivos na mesma queijaria, justificando a variação da diversidade encontrada neste trabalho.

O crescimento de fungos no queijo é determinado pela sua capacidade de crescer em baixas concentrações de oxigênio, baixo pH e baixa atividade de água ( $A_w$ ). Estes micro-organismos são também em sua maioria resistentes à ação conservante dos ácidos graxos livres e possuem atividade lipolítica que lhes permite causar alteração no queijo (CHEONG, et al. 2014).

De acordo com a Portaria nº 146, de 7 de março de 1996, que aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos (BRASIL, 1996), as amostras analisadas são classificadas como queijos de baixa umidade (até 35,9%) ou queijos de massa dura. Segundo o regulamento da Lei 14.185/2002 que trata do QMA, este deve apresentar umidade de no máximo 45,9% (média umidade) (MINAS GERAIS, 2002). Portanto, ambas as amostras analisadas apresentaram parâmetros de percentual de umidade dentro do previsto em legislação. O percentual de umidade mais baixo pode ser explicado pelo maior tempo de maturação empregado na produção das amostras objeto de estudo, visto que a legislação atual estabelece tempo mínimo de maturação de 17 dias para a microrregião do Serro e, as amostras foram produzidas como tempo de maturação entre 45 e 60 dias.

Wolfe, et al. (2014) correlacionaram a microbiota e a umidade na casca de queijos maturados e observaram que o crescimento de *Geotrichum candidum* esteve positivamente relacionado com a umidade do queijo, diferentemente dos gêneros *Scopulariopsis* e *Aspergillus*.

Segundo Figueiredo (2015), em épocas mais quentes e chuvosas, características da região do Serro, há um aumento da concentração de micro-organismos no leite cru, devido à solubilização da matéria-orgânica e da proliferação ambiental favorecida pelas temperaturas elevadas, o que gera maior risco de contaminação cruzada e, conseqüentemente, maior alteração na acidez, percentual de umidade e gordura do queijo. Durante a maturação,

leveduras e fungos filamentosos presentes no queijo metabolizam o ácido lático e produzem  $\text{NH}_3$ , aumentando assim o pH da superfície (de 4,8 a 5,2 para 6 a 8,2) (MONTEL, et al. 2014). Neste trabalho, as variações dos componentes físico-químicos do leite entre as amostras foram observadas nos parâmetros de percentual de gorduras e pH, o que pode justificar a diferença na diversidade de micro-organismos. O restante não diferiu estatisticamente.

Kure & Skaar (2000) encontraram em duas variedades de queijos noruegueses semi-duros (Jarlsberg e Norvegia) os gêneros de fungos filamentosos *Penicillium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Phoma* e *Ulocladium*. O pH dos queijos analisados variou entre 5,4 e 5,7 e o teor de gorduras esteve entre 16% e 27%. O pH ideal para o crescimento do *G. candidum* é de cerca de 5,5, mas eles podem crescer em valores de pH de 3,5 a 9,0 (ARTEAU; LABRIE; ROY, 2010). Quanto ao percentual de gorduras, as amostras A1 e A2 são classificadas como queijos gordos (45 a 59,9% de gorduras no extrato seco) de acordo com a Portaria nº 146/1996 (BRASIL, 1996) e apresentaram percentuais de gorduras de 38% e 40%, respectivamente. Segundo Costa Júnior et al. (2009), a sazonalidade tem pouca influência no teor de gordura do queijo, considerando-se o extrato seco. Os valores de pH encontrados mostram-se dentro da faixa de crescimento de fungos. Entretanto, as espécies encontradas em ambas as amostras (A1 e A2) mostraram-se susceptíveis ao crescimento em queijos com percentual de gorduras bem maiores do que o relatado por Kure & Skaar (2000).

O processo de salga do queijo é feito tanto para adequação de sabor e umidade, quanto para inibir o crescimento de patógenos. A maioria dos fungos capazes de crescer em queijo são tolerantes ao sal (NaCl) e podem crescer em condições relativamente baixas de  $A_w$ . Os percentuais de NaCl de ambas as amostras A1 e A2 foram semelhantes (0,91 e 0,93%). *G. candidum* (mais prevalente na amostra A2) é sensível ao sal. O crescimento é inibido em 1 a 2% de NaCl e nenhum crescimento é observado em 5%, entretanto a 1% o crescimento é melhor que sem nenhuma adição de sal. Queijos moles como Camembert e Brie têm 1,5 a 2,0% de NaCl. Algumas espécies de *Penicillium* podem tolerar concentrações de 5% de NaCl (MARCELLINO, et al. 2001; HYMERY, et al. 2014).

De acordo com Montel, et al. (2014) a dinâmica das interações microbianas, especialmente complexas em queijos tradicionais devido à diversidade da composição da microbiota, está longe de ser elucidada. O ecossistema microbiano determina e, ao mesmo tempo, é determinado por fatores intrínsecos ao queijo (disponibilidade de substratos e cofatores, presença de compostos inibidores/ativadores, pH e potencial redox) e fatores

extrínsecos (disponibilidade de oxigênio, temperatura, umidade relativa). Os processos de fabricação e maturação envolvidos impulsionam toda a dinâmica dos ecossistemas do queijo.

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho foi o primeiro a caracterizar a microbiota *terroir* desta região e possibilitou o conhecimento da diversidade de fungos filamentosos e leveduras da microrregião do Serro, bem como suas características físico-químicas em duas estações bem distintas do ano. As espécies identificadas diferiram entre as estações. Os principais gêneros de fungos filamentosos encontrados na amostra do verão/úmido foram *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Microascus*, *Acremonium* e espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides*, sendo que nenhuma das espécies potencialmente micotoxigênicas apresentaram teste positivo para produção de micotoxinas. Com relação às leveduras, os gêneros mais prevalentes foram *Candida*, *Kodamaea*, *Torulaspota* e *Trichosporon*. Na amostra do inverno/seco, destacou-se o fungo filamentoso *Geotrichum* e os gêneros de leveduras *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Torulaspota* e *Kluyveromyces*. Para as análises físico-químicas houve diferença no pH e teor de gordura.

O uso de duas técnicas diferentes de avaliação das espécies mostrou-se importante, contribuindo para um maior conhecimento e, ainda, permitiu identificar os fungos e leveduras que interferem na qualidade e características sensoriais do produto.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. P. et al. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food research international**, v. 91, p. 72-79, 2017.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis** of AOAC International. 18 ed. Washington, 2006.
- ARTEAU, M.; LABRIE, S.; ROY, D. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. **International Dairy Journal**, vol.20(8), p.545-554, 2010.
- BORELLI, B. M. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1115-1119, 2006.
- BRASIL. **Portaria nº 146, de 7 de março de 1996**. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, 1996. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>> Acesso em 03 de junho de 2018.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dez de 2006**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2016/03/Instru%C3%A7%C3%A3o-normativa-n%C2%B0-68-de-12-dezembro-de-2006.pdf>> Acesso em: 29 de maio de 2018.
- CARDOSO, V. M. et al. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69, p. 331-340, 2015.
- CHEONG, E. Y. L. et al. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. **Food Control**, v. 46, p. 91-97, 2014.
- CORSETTI, A.; ROSSI, J.; GOBBETTI, M. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. **International journal of food microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 1-10, 2001.
- COSTA JUNIOR, L. C. G. et al. Variações na composição de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra nas quatro estações do ano. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 64, n. 371, p. 13-20, 2009.
- CUERO, R. G.; SMITH, J. E.; LACEY, J. Stimulation by *Hyphopichia burtonii* and *Bacillus amyloliquefaciens* of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains. **Applied and environmental microbiology**. v. 53(5), p. 1142-1146, 1987.

- DELGADO, J. et al. Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. **Current Opinion in Food Science**, v. 11, p. 40-45, 2016.
- EL-FADALY, H. M. et al. Isolation and Identification of Egyptian Ras Cheese (Romy) Contaminating Fungi during Ripening Period. **Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015.
- FADDA, M. E. et al. In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 100-106, 2017.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- FIGUEIREDO, S. P. **Características do leite cru e do queijo minas artesanal produzidos na região do Serro, Minas Gerais e, produção de queijos com doces**. 110 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 2014.
- FIGUEIREDO, S.P. et al. Características do leite cru e do queijo Minas artesanal do serro em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 1, 2015.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.
- FLÓREZ, B. A. et al. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. **International Dairy Journal**. vol.17(4), p. 350-357, 2007.
- GIL-SERNA, J. et al. Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. **International journal of food microbiology**. v. 151(1), p. 113-118, 2011.
- HYMERY, N. et al. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. vol.13(4), p. 437-456, 2014.
- JODRAL, M. et al. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. **International journal of food microbiology**, v. 18, n. 2, p. 171-174, 1993.
- KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: CBS, 2002. 116 p.
- KUPIEC, B.; REVELL, B. Speciality and artisanal cheeses today: the product and the consumer. **British Food Journal**, Bradford, v. 100, n. 5, p. 236-243, 1998.
- KURE, C. F.; SKAAR, I. Mould growth on the Norwegian semi-hard cheeses Norvegia and Jarlsberg. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 133-137, 2000.
- LAVOIE, K. et al. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. **Dairy science & technology**, 92(5), 455-468, 2012.

- MARCELLINO N. et al. Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France. **Appl Environ Microbiol.** 67(10) p. 4752-4759, 2001.
- MARCELLINO, N.; BENSON, D. R. The good, the bad, and the ugly: tales of mold-ripened cheese. In: Cheese and Microbes. **American Society of Microbiology**, p. 95-131, 2014.
- MERING, C. et al. Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. **Science.** v. 315, p. 1126-1130, 2007.
- MINAS GERAIS. **Lei n. 14.185, de 31 de jan. de 2002.** Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e da outras providencias. Belo Horizonte, MG, 2002a. Disponível em: <[http://ns.ima.mg.gov.br/intranet/nova/gce/outros\\_documentos/42645.pdf](http://ns.ima.mg.gov.br/intranet/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf)> Acesso em: 29 de maio de 2018.
- MOHAMED, S. et al. An estension of the coconut cream agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production. **Journal of Applied Mibrobiology**, Hoboken, v. 57, p. 214-219, 2013.
- MONNET, C. et al. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 263, No. 1, 2014.
- MONTEL, M. C. et al. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. **International journal of food microbiology**, v. 177, p. 136-154, 2014.
- NIELSEN, K. F. et al. Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, n. 4, p. 325-336, 2004.
- NÓBREGA, J. E. et al. Variações na microbiota leveduriforme do fermento endógeno utilizado na produção do queijo Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 364, p. 14-18, 2008.
- NUNES, K. S.; DE MELLO, R. C. Um estudo de caso sobre a indicação geográfica como estratégia para comercialização do Queijo Minas Artesanal do Serro. **Rev Eletr Admin Ciênc Contábeis**, v. 2, n. 1, p. 1-20, 2013.
- OLIVEIRA, M. M. E. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102-110, 2015.
- PFLIEGLER, W. P.; PUSZTAHELYI, T.; PÓCSI, I. Mycotoxins—prevention and decontamination by yeasts. **Journal of basic microbiology**, v. 55, n. 7, p. 805-818, 2015.
- PHILIPPE, S. et al. Chemical Composition and Antifungal activity of Essential oil of Fresh leaves of *Ocimum gratissimum* from Benin against six Mycotoxigenic Fungi isolated from traditional cheese wagashi. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 22-27, 2012.
- PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species.** Sydney. Food Science Australia, 187 p. 2000.

RASIME, D. et al. Microfungi in cultivated fields in Eskişehir province (Turkey) **Journal of Basic Microbiology**, vol.45(4), p. 279-293, 2005.

RESENDE, L. V. et al. Microbial community and physicochemical dynamics during the production of 'Chicha', a traditional beverage of Indigenous people of Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 46, 2018.

SANSOM, A. et al. **Introduction to food-bourne fungi**. Centraalbureau voor schimmel cultures. Baarn and Delft. 4th ed. 2000.

ŠURANSKÁ, H. et al. Characterisation of the yeast and mould biota in traditional white pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques. **Folia microbiologica**, v. 61, n. 6, p. 455-463. 2016.

SIMONCINI, N. et al. Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. **Food Microbiology**, v. 24, p. 577-584, 2007.

VACHEYROU, M. et al. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. **International journal of food microbiology**, 146(3), p. 253-262, 2011

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

VIRGILI, R. et al. Biocontrol of *Penicillium nordicum* growth and ochratoxin A production by native yeasts of dry cured ham. **Toxins**, v. 4(2), p. 68-82, 2012.

WOLFE B. E.; et al. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. **Cell**, vol. 158, p. 422-33, 2014.

YOUNIS, G. et al. Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. **Veterinary world**, v. 10, n. 8, p. 979, 2017.

## CAPÍTULO 3

### Aspectos físico-químicos e diversidade de fungos em Queijo Minas Artesanal maturado da microrregião da Serra da Canastra

#### RESUMO

Minas Gerais é a principal região produtora de queijos do Brasil. O Queijo Minas Artesanal (QMA) da Serra da Canastra é um alimento tradicional produzido nesta região a partir de leite de vaca cru combinando-se as características geográficas e o modo de fazer típico da região. Foi fabricado de maneira rudimentar por mais de 200 anos na região, tendo, portanto, um grande valor social, cultural e econômico. A ação dos fungos filamentosos e leveduras no processo de maturação dos queijos tem grande importância. A degradação dos constituintes do leite, como proteínas e lipídios, devido à ação de enzimas fúngicas pode levar à melhoria da qualidade da textura, do sabor e aroma. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi determinar a diversidade da microbiota *terroir* (fungos filamentosos e leveduras) relacionada com o processo de maturação do Queijo Minas Artesanal produzido na microrregião da Serra da Canastra, bem como correlacionar as espécies identificadas com as características físico-químicas do produto. Foram coletadas amostras de quatro produtores diferentes nas cidades de São Roque de Minas e Piumhi - MG. Das amostras analisadas a amostra A2, apresentou maior diversidade de leveduras e a amostra A3, maior diversidade de fungos filamentosos além de maior diversidade micológica. Somente a amostra A3 apresentou 8 isolados da espécie *A. ochraceus* de um total de 12 isolados com teste positivo para produção de Ocratoxina A. A amostra A1 mostrou maior ocorrência dos fungos filamentosos *Aspergillus* sp, *Geotrichum candidum*, *Fusarium* sp e *Paecilomyces* sp e da levedura *Candida catenulata*. A amostra A4, apresentou maior ocorrência dos fungos filamentosos *Alternaria* sp, *Penicillium* sp, *Trichothecium roseum*, *Aspergillus ochraceus*, *A. oryzae*, espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* e morfotipo não identificado. Os gêneros de maior prevalência entre os fungos filamentosos foram *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Microascus* e *Acremonium*; para leveduras os gêneros de maior destaque foram *Torulaspora*, *Debaryomyces*, *Kodamaea*, *Geotrichum*, *Trichosporon* e *Candida*. Para os aspectos físico-químicos, houve diferença estatística entre as amostras como exceção do percentual de cloreto de sódio. As espécies identificadas permitiram conhecer mais sobre as comunidades microbianas. Foi possível identificar os micro-organismos responsáveis pela qualidade e características sensoriais do produto, observando que houve diferença entre as propriedades.

**Palavras-chave:** queijos artesanais. leite cru. diversidade. microbiota *terroir*.

## 1 INTRODUÇÃO

Minas Gerais é reconhecida como a principal região produtora de queijos do Brasil (GOMES, et al. 2011). O Queijo Minas Artesanal (QMA) da Serra da Canastra é um alimento tradicional produzido nesta região a partir de leite de vaca cru combinando-se de maneira singular as características geográficas e o modo de fazer típico da região (SILVA, et al. 2013). Foi fabricado de maneira rudimentar e tradicional por mais de 200 anos tendo, portanto, um grande valor social, cultural e econômico (BORELLI, et al. 2006).

Juntamente com o coalho e o sal, adiciona-se um fermento natural (pingo) ao leite cru, que consiste em parte do soro coletado após a prensagem do queijo do dia anterior. Este inóculo endógeno, rico em micro-organismos autóctones contribui para a fermentação e maturação do produto (NÓBREGA, 2012).

A maturação é um processo importante para melhoria das características sensoriais modificando a textura, aroma e sabor do queijo (FOX; McSWEENEY, 1998). Queijos produzidos a partir de leite cru adquirem sabores mais ricos e intensos do que os queijos de leite pasteurizado devido aos efeitos da microbiota vinda do leite. Estas alterações diferem de a variedade de queijo e as condições de processamento (BEUVIER, et al. 2004; ALONSO, et al. 2013).

Ecossistemas microbianos também estão inseridos no ambiente de produção. Sua presença é influenciada por fatores extrínsecos e intrínsecos e podem se originar de diversas fontes ambientais e humanas. Bokulich & Mills (2013) mostraram que o desenvolvimento de comunidades microbianas em queijarias depende do substrato e condições ambientais disponíveis e estas contribuem para características sensoriais específicas de queijos que são fabricados sem a utilização de culturas iniciadoras (DOYLE; O'TOOLE; COTTER, 2017).

A atuação dos fungos filamentosos e leveduras no processo de maturação dos queijos é de fato importante. A degradação dos constituintes do leite, como proteínas e lipídios, devido à ação de enzimas fúngicas pode levar à melhoria da qualidade da textura, do sabor e do valor nutricional do queijo (HYMERY, 2014; CARDOSO, et al. 2015).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi determinar a diversidade da microbiota *terroir* (fungos filamentosos e leveduras) relacionada com o processo de maturação do Queijo Minas Artesanal produzido na microrregião da Serra da Canastra, bem como correlacionar as espécies identificadas com as características físico-químicas do produto.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

As amostras foram coletadas em queijarias produtoras certificadas, localizadas nos municípios de São Roque de Minas e Piumhi, região da Serra da Canastra, no estado de Minas Gerais, Brasil.

Foram coletadas doze amostras, sendo três de cada produtor, de QMA maturados entre 45 e 60 dias (Figura 1) no período de verão chuvoso e quente (março) no ano de 2017 (Tabela 1).

As amostras foram embaladas (embalagem própria), armazenadas em sacos estéreis e transportadas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas, do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras, onde foram posteriormente analisadas.

Figura 1 Amostra de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra



Fonte: Autora (2017)

Tabela 1 Amostras de Queijo Minas Artesanal coletadas na microrregião da Serra da Canastra

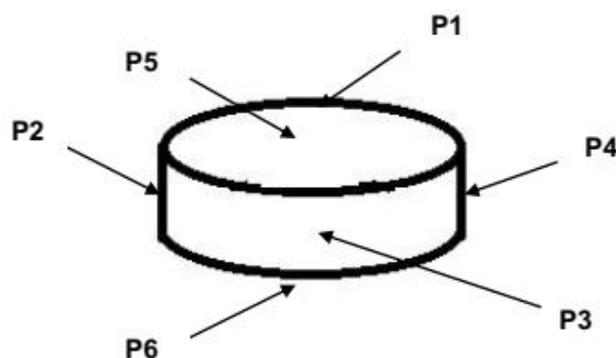
Amostra	Local	Período	Estação/Clima	Tempo de maturação	Coordenadas geográficas		
					Latitude	Longitude	Altitude
Amostra 1	São Roque de Minas – MG	março 2017	Verão/Úmido	45-60 dias	20° 13' 49" S	46° 23' 04" W	854 m
Amostra 2	São Roque de Minas – MG	março 2017	Verão/Úmido	45-60 dias	20° 12' 30" S	46° 21' 35" W	860 m
Amostra 3	São Roque de Minas – MG	março 2017	Verão/Úmido	45-60 dias	20° 11' 08" S	46° 21' 43" W	766 m
Amostra 4	Piumhi – MG	março 2017	Verão/Úmido	45-60 dias	20° 22' 31" S	45° 58' 39" W	769 m

Fonte: Autora (2018)

## 2.2 Avaliação da microbiota por método dependente de cultivo

Foram realizados dois métodos para o isolamento de fungos filamentosos e leveduras das amostras de QMA. O primeiro consistiu no repique direto da casca do queijo para meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MA) (extrato de malte: 20 g; ágar: 20 g; água destilada: 1 L). O segundo se deu pela técnica de diluição seriada. Para realização da técnica utilizou-se 25 g de casca de queijo triturada grosseiramente, obtidas de 4 pontos equidistantes da lateral (P1, P2, P3 e P4), 1 ponto central da base e outro da superfície (P5 e P6) conforme a Figura 2. A casca triturada foi adicionada à 225 mL de água peptonada com concentração de 0,1%. A solução foi acondicionada em saco estéril e levada para agitação em Stomacker, onde foi submetida à 490 golpes/2 minutos. Em seguida procedeu-se com a diluição seriada e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram espalhadas na superfície dos meios de cultura e incubadas em BOD a 25 °C por 5 a 7 dias. Os meios de cultura utilizados foram Ágar Dichloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (glicose: 10,0 g; peptona bacteriológica: 5,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,5 g; solução de rosa de bengala a 5%: 0,5 mL; dicloran: 1,0 mL; água destilada: 1 L; ágar: 15,0 g; cloranfenicol: 1 mg) e Dichloran Glicerol Medium Base (DG18) (dicloran: 1,0 mL; peptona bacteriológica: 5,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,5 g; glicerol: 220 g; ágar: 15,0g; cloranfenicol: 1 mg; água destilada: 1 L).

Figura 2 Modelo esquemático de preparo da amostra para técnica de diluição seriada



Fonte: Autora (2018)

Após o período de incubação foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e empregada a técnica de raiz quadrada para determinar o total de fungos filamentosos e leveduras que seriam isolados. Em seguida, os isolados foram transferidos para meio de purificação MA e incubados em BOD 25 °C por 7 dias (fungos filamentosos) e 28 °C

por 48 horas (leveduras). Após a obtenção das colônias puras os isolados foram preservados e iniciou-se o processo de identificação.

### 2.3 Preservação dos isolados

Os fungos filamentosos identificados foram preservados em duplicata por dois métodos distintos. Por meio de coleta dos esporos com auxílio de papel filtro em tubos Eppendorf, preservados à temperatura de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, como método principal de preservação, a técnica de criopreservação a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As leveduras identificadas foram armazenadas em duplicata em tubos Eppendorf, preservados pela técnica de criopreservação a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Primeiramente foram adicionados 0,5 mL de caldo YEPG em tubos Eppendorf. Em seguida a levedura foi repicada com o auxílio de uma alça de platina no caldo nutriente e incubada em BOD a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 horas ou até turvação do meio. Posteriormente foi adicionado 0,5 mL de solução de glicerol a 40% e armazenada à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Outro método utilizado para preservação para preservação das leveduras foi o repique direto para uma solução crioprotetora de glicerol a 20%.

Os isolados após a identificação serão depositados na Coleção de Cultura de Microorganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) da Universidade Federal de Lavras.

### 2.4 Identificação de fungos filamentosos

O método de identificação utilizado depende do gênero de fungo filamentoso encontrado, sendo utilizado para as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, o Manual de Klich (2002), para o gênero *Penicillium*, o Manual de Pitt (2000) e para os demais gêneros, o Manual de Samson et al. (2000). Os isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* foram crescidos em meios de cultura Ágar Czapek Levedura (CYA) [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 1,0 g; concentrado czapec: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g, ágar: 15,0 g, água destilada: 1 L; (concentrado czapec:  $\text{NaNO}_3$ : 30,0 g,  $\text{KCl}$ : 5,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 5,0 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,1 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,1 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 0,05 g, água destilada: 100 mL)] a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e Ágar Extrato de Malte e Levedura (MEA) (extrato de malte: 20,0 g, peptona bacteriológica: 1,0 g, glicose: 30,0 g, ágar: 20,0 g, água destilada: 1L) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um período de 7 dias retirou-se as características

macroscópicas e microscópicas das colônias dos fungos. Para os demais gêneros utilizou-se o meio de cultura MEA a 25 °C por 7 dias para caracterização morfológica.

## 2.5 Análises quimiotaconômica de fungos filamentosos potencialmente toxigênicos

Os fungos filamentosos isolados identificados como potencialmente produtores de Ocratoxina A (OTA) e Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) como as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* das Seções *Nigri*, *Circundati* e *Flavi*, bem os potencialmente produtores de Citrinina como as espécies do gênero *Penicillium* da Seção *Citrina* foram cultivados em meio de cultura Ágar Coco (leite de coco: 400 mL; ágar: 15,0 g e água destilada: 400 mL) para verificação de produção de micotoxinas. Após incubação por 7 a 10 dias a 25 °C conforme descrito por Mohamed et al. (2013). Verificou-se a produção de micotoxinas em luz ultravioleta com  $\lambda$  366 nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados caracterizados como produtores foram avaliados pelo método de cromatografia de camada delgada para confirmação da produção e identificação da micotoxina (Plug Agar).

Para realização da técnica de Plug Agar, as espécies micotoxigênicas do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri* foram inoculadas em meio Ágar Czapek Levedura (CYA) [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g; concentrado czapec: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g, ágar: 15,0 g, água destilada: 1 L; (concentrado czapec: NaNO<sub>3</sub>: 30,0 g, KCl: 5,0 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 5,0 g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05 g, água destilada: 100 mL)] por 7 dias a 25 °C. Já as espécies pertencentes às Seções *Circundati*, *Flavi* e *Citrina* foram inoculadas em meio Ágar Extrato de Levedura Sacarose (YES) (extrato de levedura: 20,0 g; sacarose: 150 g; ágar: 20,0 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1 g; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05 g; água destilada: 1 L), também por 7 dias a 25 °C conforme Filtenborg & Frisvad (1980).

Utilizou-se uma solução padrão de OTA e Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e Citrinina (SIGMA-ALDRICH), e a placa de cromatografia de camada delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20 x 20) com fase móvel composta por tolueno acetato de etila e ácido fórmico (TEF) 90% (60:30:10). Após a eluição, e secagem das placas em capela de fluxo laminar, a verificação quanto à produção de micotoxinas foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$  366 nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de OTA, Citrinina, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 apresentaram um fator de retenção e um *spot* de fluorescência semelhante ao dos padrões utilizados.

## 2.6 Identificação das leveduras

As leveduras isoladas foram cultivadas em placas contendo o meio Yeast Extract Peptone Glucose Ágar (YEPG) (extrato de levedura 1%; peptona bacteriológica 2%; glicose 2%, ágar 1,5%) incubados a 28 °C por um período de 18 horas e identificadas por Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF). Em seguida, aproximadamente  $3 \times 10^7$  células de cada morfotipo foram transferido para microtubos estéreis. Posteriormente, 3 µL de ácido fórmico / acetonitrila (25:75) foram adicionados em cada microtubo. Os microtubos então foram vortexados por 1 minuto e, em seguida, 1 µL da suspensão foi transferida para a placa MALDI flex target (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Após evaporação quase completa do líquido na placa, 1 µL de solução matriz foram adicionados e homogeneizado [solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) em acetonitrila a 50%; ácido trifluoroacético a 2,5%] (OLIVEIRA et al. 2015).

A cepa *Escherichia coli* K12 obtida da Micoteca da Universidade do Minho (MUM, <http://www.micoteca.deb.uminho.pt>) foi utilizada para extração *in situ* de proteínas que, por sua vez, foram usadas como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS. A cepa de *E. coli* K12 foi cultivada em meio Ágar Luria-Bertani (LB) (bactotripton, 1,0 g; extrato de bactoheyeast, 0,5 g; NaCl, 1,0 g; ágar, 15,0 g; água destilada, 1 L) a 37 °C por 18 horas. Após incubação, aproximadamente 1 µg de material celular de uma única colônia de *E. coli* K12 foi transferido para a placa MALDI flex target e a solução matriz foi adicionada e homogeneizada. Cada estirpe foi preparada em triplicata para avaliar reprodutibilidade. As amostras foram então analisadas em um MALDI-TOF microflex LT spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), usando o MALDI Biotyper 3.0 automatic system (RESENDE et al. 2018).

## 2.7 Avaliação da microbiota por método independente de cultivo

Para realização da análise metagenômica foram enviados 3 gramas de cada amostra de QMA devidamente congeladas para a empresa responsável pelo sequenciamento. Toda a análise foi realizada pelo Laboratório GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro – RJ, Brasil). Para manter a confiabilidade dos dados, o controle de qualidade (QC) foi realizado em cada etapa do procedimento (Figura 3). Os tópicos abaixo descrevem as etapas do protocolo seguido.

Figura 3 Fluxograma da análise metagenômica



Fonte: Autora (2018)

### A. Extração do DNA genômico

Utilizou-se aproximadamente 500 mg das amostras para extração do DNA genômico. O DNA total do genoma das amostras foi extraído utilizando-se o método CTAB/SDS. A concentração e a pureza do DNA foram monitoradas em géis de agarose a 1%. De acordo com a concentração, o DNA foi diluído para 1 ng/μL utilizando água estéril.

### B. Geração de Amplicon

A região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal foi amplificada utilizando *primer* específico e *barcodes* para diferenciar as amostras. A região ITS é a mais usada para fungos sendo a ITS2 utilizada nesta análise. Todas as reações de PCR foram realizadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs).

### C. Quantificação, qualificação e amplificação dos produtos PCR

O mesmo volume de tampão de carga 1X (contendo SYB green) foi misturado aos produtos de PCR e corrido por eletroforese em gel de agarose a 2% para detecção. Amostras com faixa principal brilhante entre 400-450 bp foram escolhidas para testes posteriores.

Os produtos de PCR foram misturados em proporções de mesma densidade. Em seguida, foram purificados com o Kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen, Alemanha).

### D. Preparação e sequenciamento da biblioteca

As bibliotecas foram geradas utilizando o kit NEBNext® Ultra™ DNA Library Pre (Illumina, USA) e os códigos de índice foram adicionados seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade da biblioteca foi avaliada no Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo

Scientific, USA) e sistema Agilent Bioanalyzer 2100 (Santa Clara, USA). Por fim, a biblioteca foi sequenciada em uma plataforma Illumina e *paired-end reads* de 250 pb foram gerados.

### **E. Análise dos dados (bioinformática)**

As *paired-end reads* foram atribuídas a amostras com base no seu *barcode* que foi retirado juntamente com a sequência do *primer*. Estas foram emparelhadas usando o *software* FLASH 1.2.7 que mesclou os pares para identificar as sobreposições geradas a partir da extremidade oposta do mesmo fragmento de DNA a fim de reconstruir a região ITS. Os fragmentos pareados foram filtrados pelo *software* QIIME 1.7.0 para obtenção dos fragmentos de melhor qualidade. Em seguida os fragmentos foram comparados ao banco de dados de referência (Gold Database) utilizando-se o algoritmo UCHIME (UCHIME Algorithm) para detectar sequências de quimera que foram posteriormente removidas.

A análise das sequências foi realizada pelo *software* Uparse 7.0.1001. Sequências com similaridade de 97% foram atribuídas às mesmas UTOs (Unidade Taxonômica Operacional) cuja sequência representativa foi rastreada para anotação. Para cada sequência representativa o banco de dados UNITE foi usado com base no algoritmo BLAST para anotar as informações taxonômicas.

A fim de determinar a relação filogenética de diferentes UTOs e a diferença entre as espécies dominantes em diferentes amostras/grupos, foi realizado o alinhamento de múltiplas sequências usando o *software* MUSCLE 3.8.31.

As informações de abundância das UTOs foram normalizadas usando um padrão de número de sequência correspondente à amostra com as menores sequências. As análises subsequentes de  $\alpha$  e  $\beta$  diversidade foram realizadas com base nesses dados normalizados de saída. A análise de  $\alpha$  diversidade avalia a complexidade da diversidade de espécies para uma amostra. Já a análise de  $\beta$  diversidade é utilizada para avaliar diferenças de amostras em complexidade de espécies.

## **2.8 Análises físico-químicas**

As amostras de QMA foram submetidas às análises físico-químicas em três repetições para determinação dos teores de umidade, gorduras e cloreto de sódio além de pH. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Leite e Produtos Lácteos do Departamento de

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

### **2.8.1 Umidade**

A determinação do percentual de umidade se deu por secagem da amostra em estufa a  $102 \pm 2$  °C. Após secagem as amostras foram mantidas à temperatura ambiente em dessecador até obtenção de massa constante.

### **2.8.2 Cloreto de Sódio**

O teor de cloreto de sódio foi obtido por meio do método argentométrico de Mohr, baseado na titulação do cloreto de sódio com nitrato de prata em presença de cromato de potássio, como indicador.

### **2.8.3 pH**

Os valores de pH foram determinados por análise em medidor de pH.

### **2.8.4 Gorduras**

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

## **2.9 Análises estatísticas**

A análise estatística da diversidade de fungos filamentosos e leveduras em Queijo Minas Artesanal e sua incidência de acordo com as características físico-químicas foi realizada por meio da Análise de Componente Principal (PCA), utilizando o *software* SensoMaker (PINHEIRO; NUNES; VIETORIS, 2013). Para avaliar a diferença estatística

entre as análises físico-químicas realizadas, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com posterior teste de Tukey utilizando o *software* Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

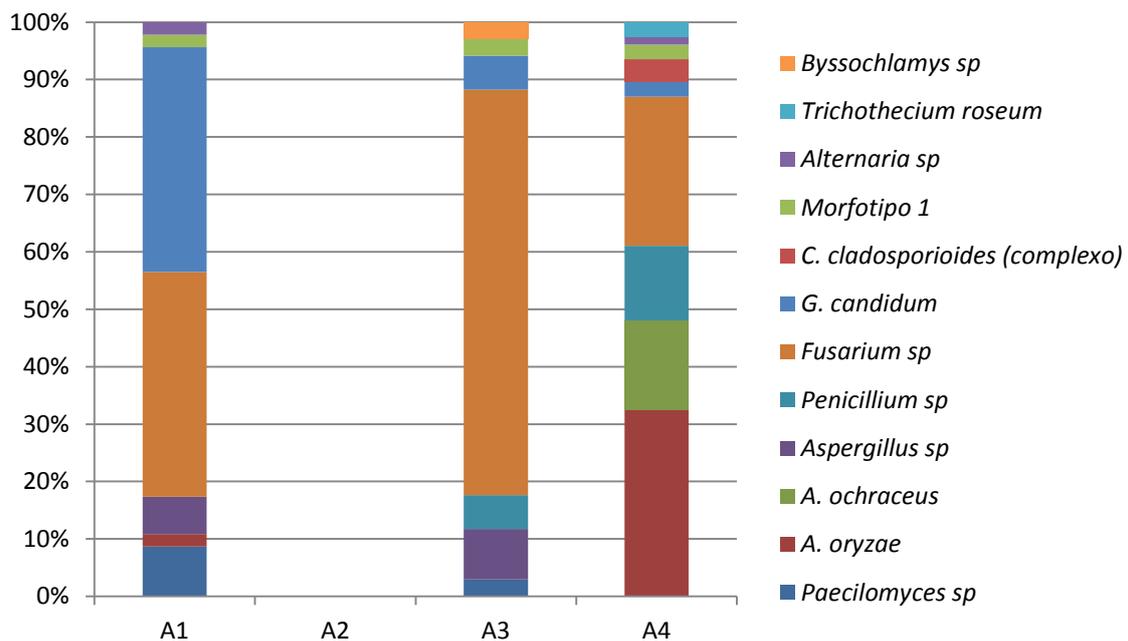
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Microbiota avaliada pelo método dependente de cultivo

##### 3.1.1 Fungos filamentosos

Da amostra A1, obteve-se populações médias totais de  $3,4 \times 10^7$  UFC/g no meio DRBC e  $11,3 \times 10^7$  UFC/g no meio DG18 e identificou-se 36 isolados de fungos filamentosos. Da amostra A3, identificou-se 77 isolados e as populações médias totais foram de  $6 \times 10^6$  UFC/g no meio DRBC e  $4,4 \times 10^6$  UFC/g. Da amostra A4, identificou-se 32 isolados e as populações médias totais foram  $2,1 \times 10^6$  UFC/g (DRBC) e  $1,7 \times 10^7$  UFC/g (DG18). As espécies identificadas então dispostas no Gráfico 1 de acordo com a porcentagem de isolados de cada espécie.

Gráfico 1 Frequência de ocorrência de espécies de fungos filamentosos presentes nas amostras A1, A2, A3 e A4 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra



Fonte: Autora (2018)

Na amostra A1 foram identificados os fungos filamentosos *Paecilomyces sp* (8,69%), *Aspergillus sp* (6,52%), *Aspergillus oryzae* (2,17%), *Fusarium sp* (39,13%), *Geotrichum candidum* (39,13%), *Alternaria sp* (2,17%) e morfotipo 1 não identificado (2,17%). Na A3 estiveram presentes *Paecilomyces sp* (2,94%), *Aspergillus sp* (8,82%), *Penicillium sp* (5,88%) *Fusarium sp* (70,58%), *Byssochlamys sp* (2,94%) e morfotipo 1 não identificado (2,94%). Na

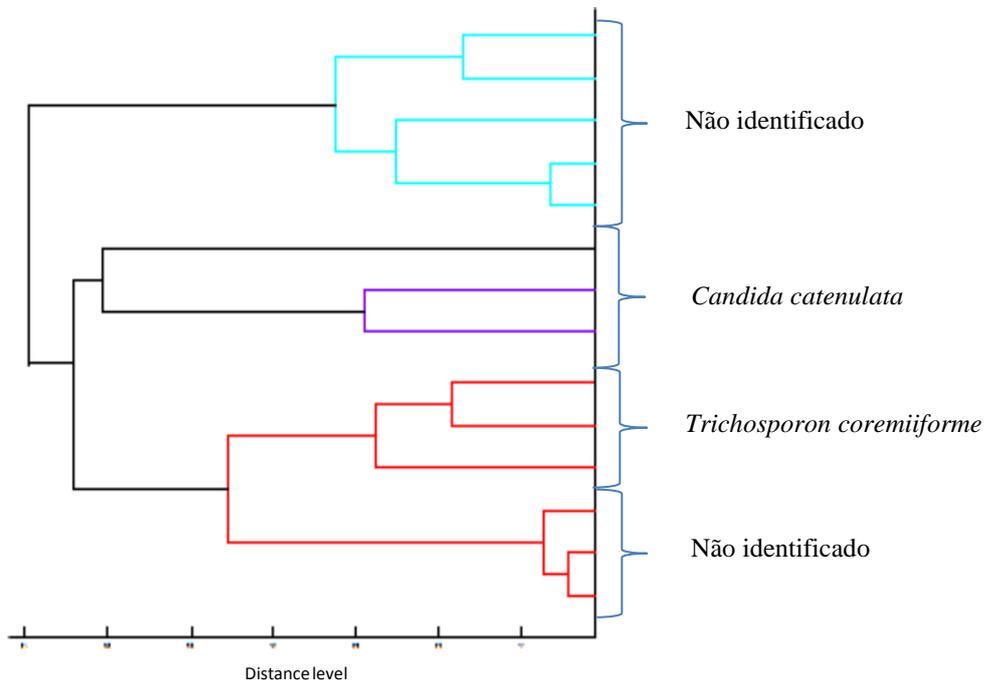
amostra A4 as espécies presentes foram *A. oryzae* (32,5%), *A. ochraceus* (15,6%), *Penicillium* sp (13%), *Fusarium* sp (26%) *G. candidum* (2,6%), *Alternaria* sp (1,3%), *Trichothecium roseum* (2,6%), espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* (3,9%) e morfotipo 1 não identificado (2,6%). A amostra A2 não apresentou contaminação por fungos filamentosos.

Somente a amostra A3 apresentou 8 isolados da espécie *A. ochraceus* de um total de 12 isolados com teste positivo para produção de OTA. Os demais fungos filamentosos testados não apresentaram produção de metabólitos secundários compatíveis com as micotoxinas Ocratoxina A, Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e Citrinina.

### 3.1.2 Leveduras

Identificou-se 24 leveduras da amostra A1 de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra. Da amostra A2 foram identificadas 49 leveduras e suas populações médias totais foram de  $2 \times 10^6$  UFC/g no meio de cultura DRBC e  $3,8 \times 10^7$  UFC/g no meio DG18. e das amostras A3 e A4 identificou-se 8 e 3 isolados de leveduras respectivamente. Nas Figuras 4, 5, 6 e 7 a seguir observa-se o dendograma das leveduras isoladas das amostras A1, A2, A3 e A4, respectivamente, de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.

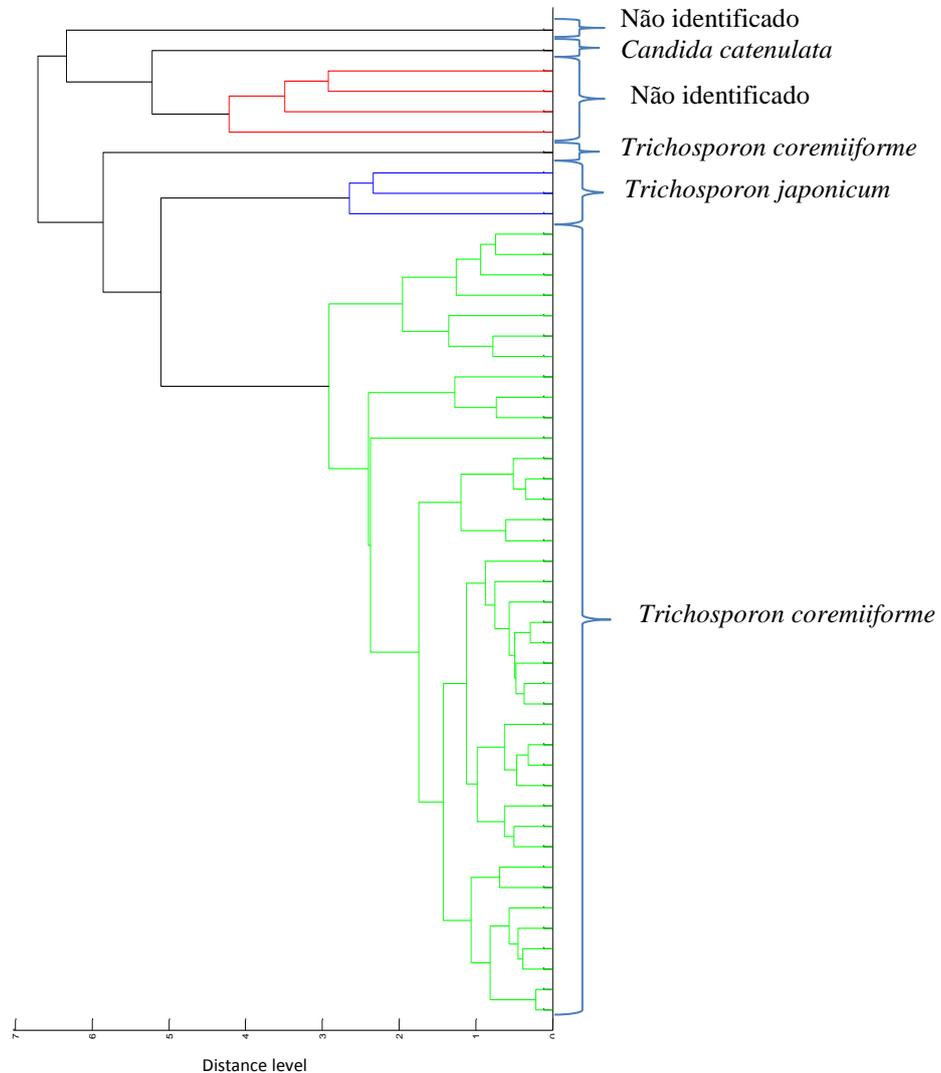
Figura 4 Dendograma das leveduras isoladas da amostra A1 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra



Fonte: Autora (2018)

Das 14 leveduras selecionadas da amostra A1 para identificação 21,42% foram identificadas como *Trichosporon coremiiforme*, 57,16% como *Candida catenulata* e outros 33,33% de morfotipo que não puderam ser identificados.

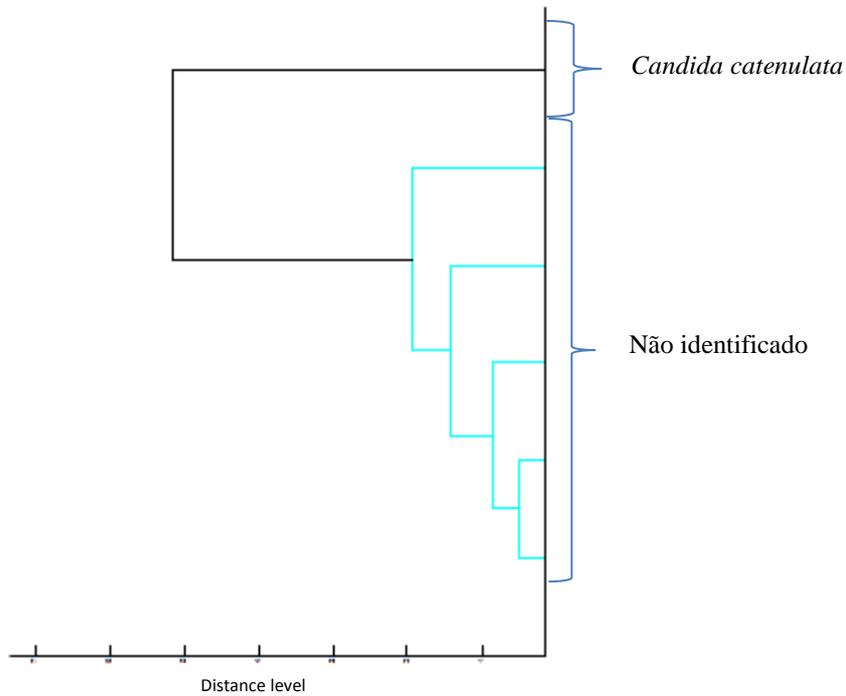
Figura 5 Dendograma das leveduras isoladas da amostra A2 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra



Fonte: Autora (2018)

Cerca de 81,6% das 49 leveduras selecionadas pertencentes à amostra A2 foram identificadas como *Trichosporon coremiiforme*, seguidas por *Trichosporon japonicum* (6,1%) e *Candida catenulata* (2%). 10% dos isolados não foram identificados.

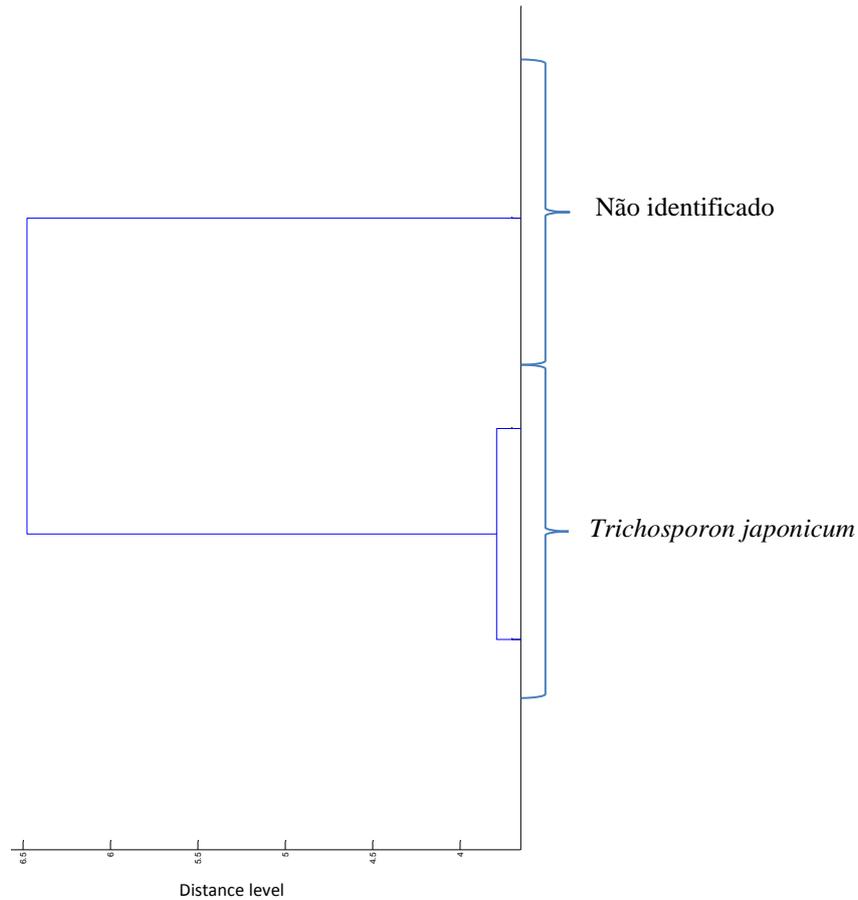
Figura 6 Dendograma das leveduras isoladas da amostra A3 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra



Fonte: Autora (2018)

A espécie *Candida catenulata* representou 16,66% das 6 leveduras analisadas da amostra A3. O restante não pode ser identificado (83,33%).

Figura 7 Dendograma das leveduras isoladas da amostra A4 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra

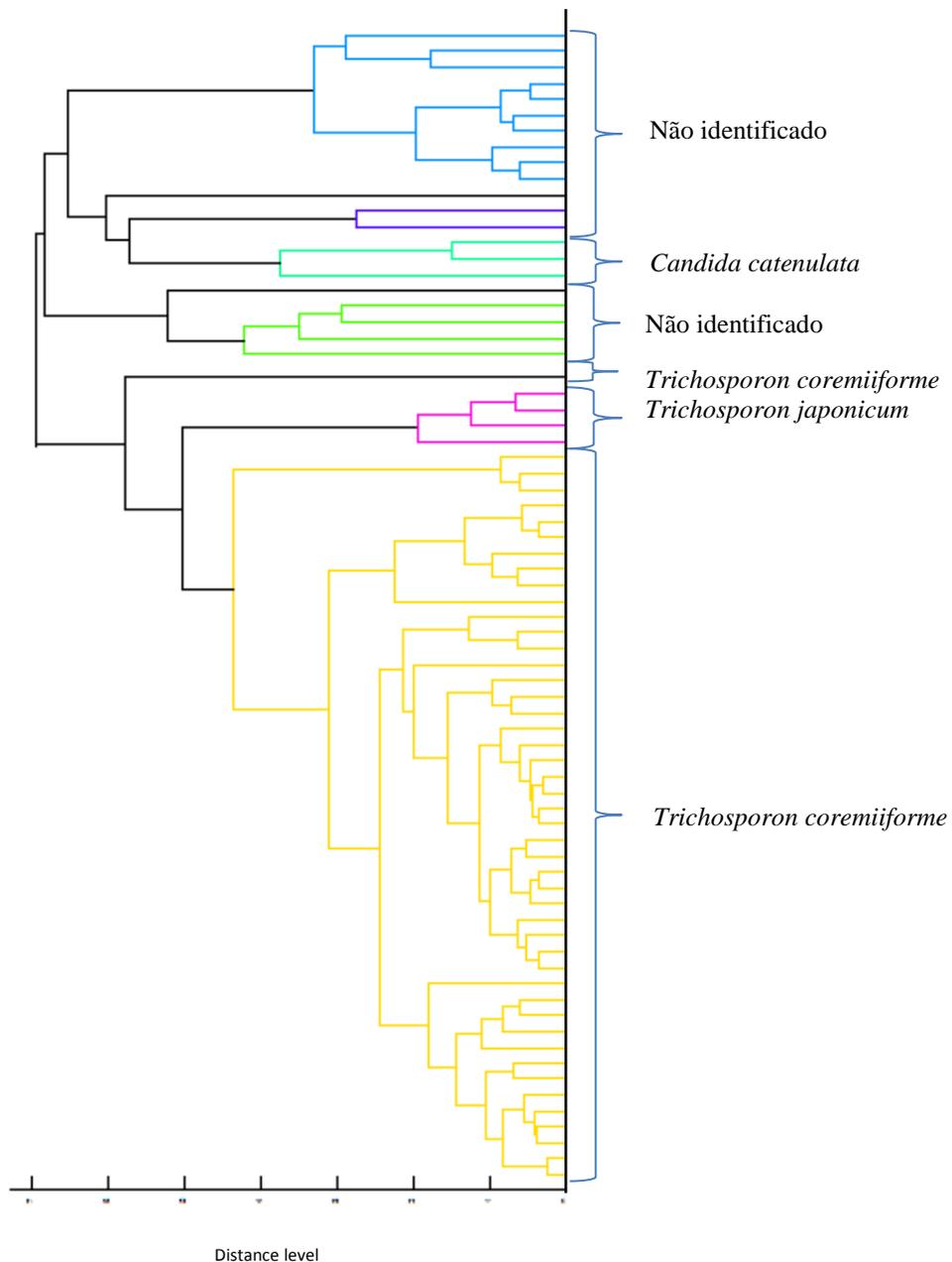


Fonte: Autora (2018)

A amostra 4 foi a que menos apresentou diversidade de leveduras tendo somente 3 isolados selecionados para a identificação. Deste total, 2 leveduras foram identificadas como *Trichosporon japonicum* (66,6%) e o isolado restante não foi identificado (33,3%).

A Figura 8 a seguir mostra o dendrograma das leveduras isoladas de das quatro amostras (A1, A2, A3 e A4) de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra. Com este agrupamento foi possível dimensionar a diversidade de leveduras da região e não somente das amostras.

Figura 8 Dendograma das leveduras isoladas das amostras A1, A2, A3 e A4 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra



Fonte: Autora (2018)

Após agrupamento do perfil proteico das 72 leveduras isoladas de QMA selecionadas para identificação foi possível perceber uma prevalência da espécie *Trichosporon coremiiforme* (72,24%). *Trichosporon japonicum* representou 5,55%, seguido de *Candida catenulata* (4,16%). 18,05% dos isolados não foram identificados.

### 3.2 Análises físico-químicas

Na Tabela 2, observa-se as características físico-químicas das amostras A1, amostra A2, amostra A3 e amostra A4 de QMA analisadas:

Tabela 2 Composição físico-química das amostras A1, A2, A3 e A4 de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra

Amostra	Aspectos físico-químicos			
	% Umidade	% Gorduras	% NaCl	pH
A1	28,211 ± 0,24 a	32 ± 0 a	0,93 ± 0,08 a	5,52 ± 0,04 a
A2	18,24 ± 0,67 b	29 ± 0 b	0,98 ± 0,08 a	5,29 ± 0,005 b
A3	21,136 ± 0,24 c	20,5 ± 0 c	0,93 ± 0,03 a	5,53 ± 0,01 a
A4	22,749 ± 3,23 c	40 ± 0 d	0,87 ± 0,13 a	5,33 ± 0,02 b

\*Letras diferentes na mesma coluna mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$ .

Fonte: Autora (2018)

A avaliação do percentual de umidade mostrou o menor valor na amostra A2 (18,24%), seguido das amostras A3 e A4 com 21,136% e 22,749% respectivamente que não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ). O maior percentual é referente à amostra A1 com 28,211% de umidade.

O teor de gorduras analisado mostrou que todas as amostras diferiram estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). O menor valor (20,5%) foi encontrado na amostra A3, seguido da amostra A2 com 29%, amostra A1 com 32% e por fim, amostra A4 com maior valor (40%). A partir destes valores (gorduras e umidade) foi possível obter o percentual de gorduras no extrato seco (GES): 44,4% para amostra A1; 35,4% para amostra A2; 25,9% e para a amostra A3 e 51,7% para a amostra A4.

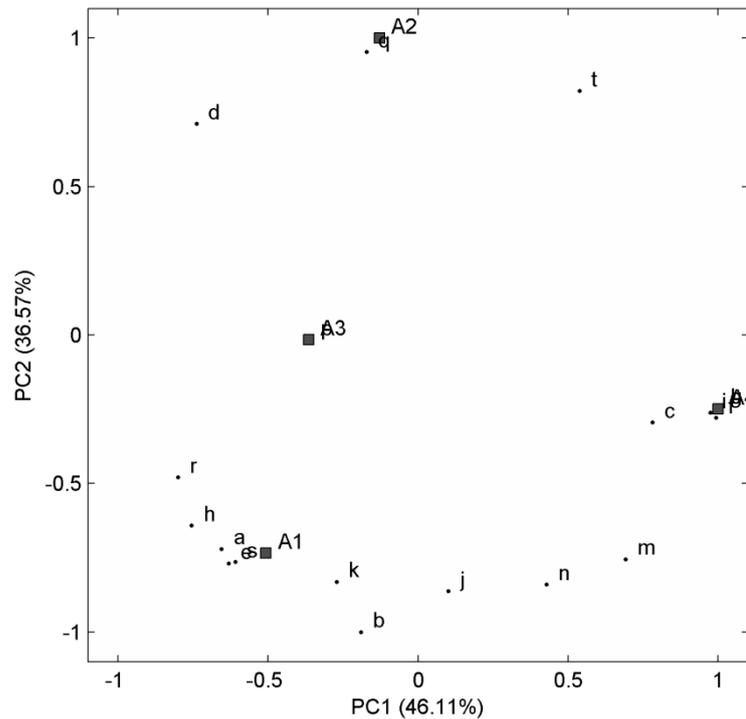
O único aspecto que não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi o percentual de cloreto de sódio (NaCl). Os valores variaram de 0,87% (amostra A4), 0,93% (amostras A1 e A3) e 0,98% (amostra A2).

Para os valores de pH, as amostras A1 e A3 foram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ) mostrando valores de 5,52 e 5,53 respectivamente. Houve também semelhança estatística ( $p > 0,05$ ) entre as amostras A2, com valor de pH 5,29 e amostra A4, com pH 5,33.

### 3.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

As amostras foram submetidas à análise de componentes principais (PCA) (Figura 9).

Figura 9 Análise de Componentes Principais (PCA) da diversidade micológica e sua correlação com as características físico-químicas das amostras A1, A2, A3 e A4 de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra



Fonte: Autora (2018)

Percebe-se que a amostra A4 diferiu estatisticamente das demais.

Na amostra A1 observa-se uma maior ocorrência dos fungos filamentosos *Aspergillus* sp, *Geotrichum candidum*, *Fusarium* sp e *Paecilomyces* sp e da levedura *Candida catenulata*. Os aspectos físico-químicos que estiveram correlacionados com esta amostra foram pH e umidade.

Para a amostra A2 houve uma maior ocorrência das leveduras *Trichosporon japonicum* e *T. coremiiforme*. Não houve maior ocorrência de fungos filamentosos, pois esta amostra não apresentou contaminação dos mesmos. Quanto às características físico-químicas, o percentual de NaCl mostrou-se correlacionado tanto com a amostra A2 quanto com a amostra A3. Nesta última, apenas o fungo filamentoso *Byssochlamys* sp apresentou maior correlação.

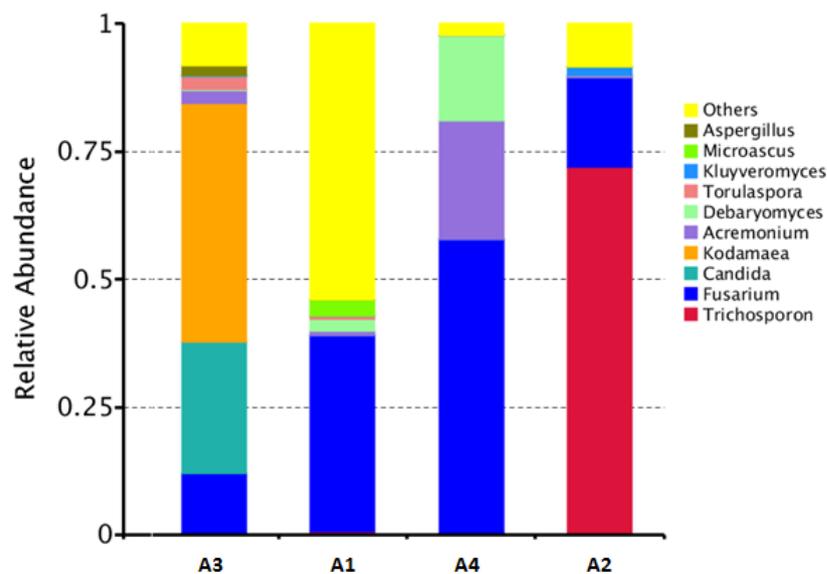
A amostra A4, mais distinta estatisticamente entre elas, percebeu-se como aspecto físico-químico de mais destaque o teor de gorduras. Houve uma maior ocorrência dos fungos *Alternaria* sp, *Penicillium* sp, *Trichothecium roseum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* e morfotipo não identificado Sp. Não houve maior correlação estatística desta amostra com as espécies de leveduras identificadas.

### 3.4 Microbiota avaliada pelo método independente de cultivo

A partir do estudo metagenômico das amostras um total de 229 OTU's, contendo 35 gêneros e 36 espécies foram observadas na amostra A1. Na amostra A2 encontrou-se 217 OTU's contendo 33 gêneros e 33 espécies. Na amostra A3 encontrou-se 252 OTU's contendo 39 gêneros e 42 espécies. Por fim, na amostra A4 encontrou-se 189 OTU's contendo 24 gêneros e 25 espécies.

O Gráfico 2 mostra a abundância relativa dos gêneros de fungos filamentosos e leveduras encontrados nas amostras A1, A2, A3 e A4 de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.

Gráfico 2 Abundância relativa de gêneros encontrados nas amostras A1, A2, A3 e A4 de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra



Fonte: Autora (2018)

Na amostra A1 observa-se uma prevalência dos gêneros de fungos filamentosos *Fusarium*, *Microascus* e *Acremonium* e dos gêneros de leveduras *Torulaspota* e *Debaryomyces*. Os gêneros menos prevalentes foram *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Atractiella*, *Mucor*, *Gibellulopsis*, *Neosetophoma*, *Cryptococcus*, *Exophiala*, *Mortierella*, *Trichoderma*, *Minimedusa*, *Sarocladium*, *Gibberella*, *Dendryphion*, *Operculomyces*, *Veronaea*, *Thelebolus*, *Rhizophlyctis*, *Metarhizium*, *Cladorrhinum*, *Tetragoniomyces*, *Scutellinia*, *Mucor*, *Pseudogymnoascus*, *Tetracladium*, *Phaeonectriella*, *Monographella*, *Cladosporium*, *Candida*, e *Emericellopsis* (ANEXO).

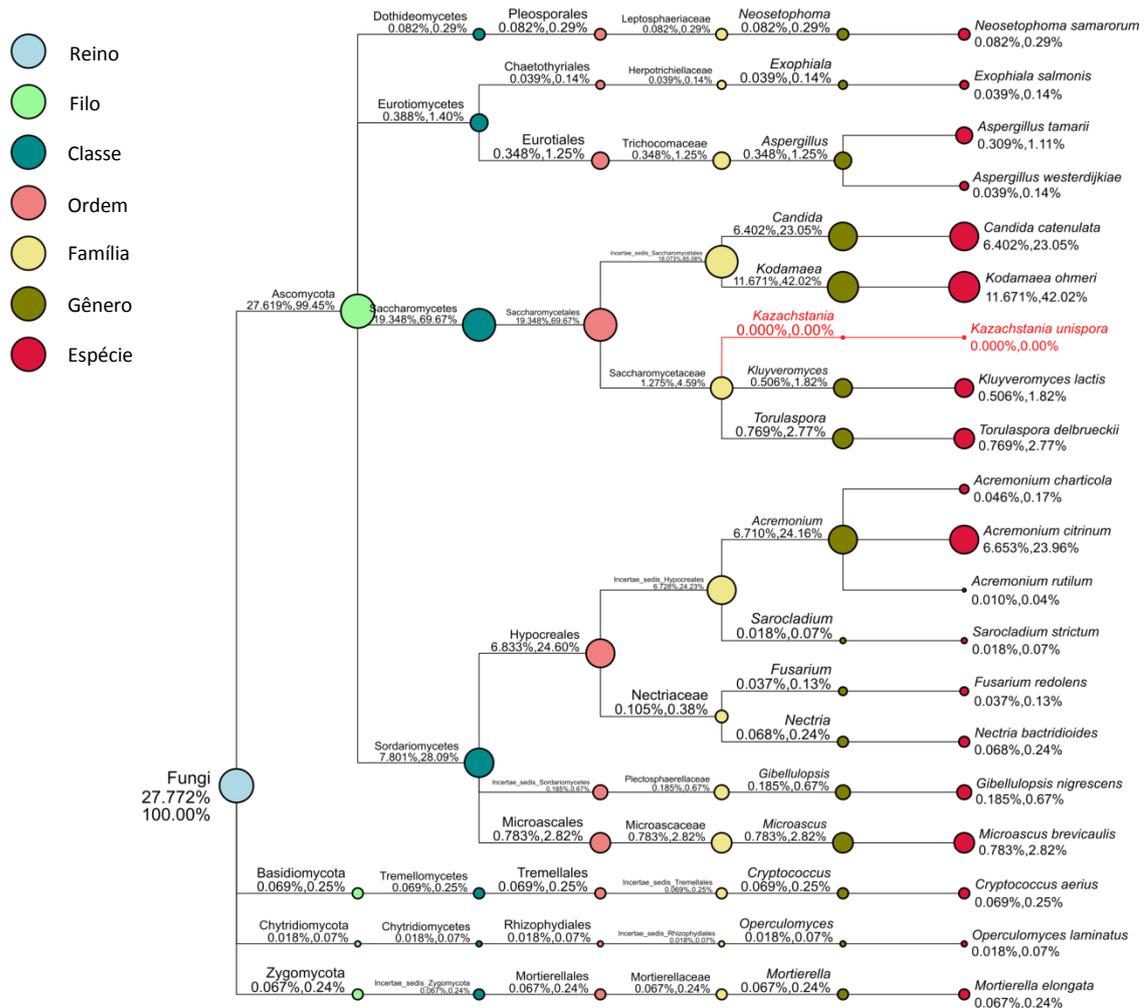
Os gêneros mais prevalentes na amostra A2 referem-se às leveduras do gênero *Trichosporon*, *Kluyveromyces* e *Torulaspota* seguidos do gênero de fungos filamentosos *Fusarium*. Em menor prevalência observam-se os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Emericellopsis*, *Atractiella*, *Tetracladium*, *Monographella*, *Scutellinia*, *Pseudogymnoascus*, *Metarhizium*, *Cladorrhinum*, *Tetragoniomyces*, *Trichoderma*, *Minimedusa*, *Microdochium*, *Sarocladium*, *Gibberella*, *Dendryphion*, *Operculomyces*, *Veronaea*, *Nectria*, *Exophiala*, *Gibellulopsis*, *Neosetophoma*, *Aspergillus*, *Microascus*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Acremonium* e *Candida* (ANEXO).

Para a amostra A3 nota-se uma maior diversidade micológica em relação às outras amostras. Os gêneros de leveduras *Kodamaea*, *Candida* e *Torulaspota* estiveram mais prevalentes seguidos dos gêneros de fungos filamentosos *Fusarium*, *Aspergillus* e *Acremonium*. Em menor prevalência observam-se os gêneros *Penicillium*, *Mucor*, *Trichosporon*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Emericellopsis*, *Septoriella*, *Saccharmyces*, *Phaeonectriella*, *Monographella*, *Tetracladium*, *Pseudogymnoascus*, *Scutellinia*, *Rhizophlyctis*, *Metarhizium*, *Cladorrhinum*, *Tetragoniomyces*, *Cryptococcus*, *Exophiala*, *Mortierella*, *Trichoderma*, *Minimedusa*, *Microdochium*, *Sarocladium*, *Gibberella*, *Dendryphion*, *Operculomyces*, *Veronaea*, *Gibellulopsis*, *Neosetophoma*, *Microascus*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* (ANEXO).

Por fim, na amostra A4 prevaleceram os gêneros de fungos filamentosos *Fusarium* e *Acremonium*, seguidos do gênero de levedura *Debaryomyces*. Em menor prevalência observam-se os gêneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulaspota*, *Atractiella*, *Gibellulopsis*, *Neosetophoma*, *Nectria*, *Cryptococcus*, *Exophiala*, *Mortierella*, *Trichoderma*, *Minimedusa*, *Microdochium*, *Sarocladium*, *Gibberella*, *Scutellinia*, *Pseudogymnoascus*, *Monographella*, *Trichosporon*, *Cladosporium* e *Emericellopsis* (ANEXO).

Na Figura 10 se observa a diversidade de espécies de fungos filamentosos e leveduras, identificados pela análise metagenômica, presentes nas quatro amostras analisadas de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra.

Figura 10 Diversidade de espécies de fungos filamentosos e leveduras de Queijo Minas Artesanal da microrregião da Serra da Canastra



Fonte: Autora (2018)

Dentre as principais espécies presentes nas amostras de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra observam-se *Kodamaea ohmeri*, *Acremonium citrinum* e *Candida catenulata* com 42,02%, 23,05% e 23,96% respectivamente. Outras espécies identificadas nestas amostras foram *Gibellulopsis nigrescens*, *Microascus brevicaulis*, *Nectria bactridioides*, *Neosetophoma samarorum*, *Exophiala salmonis*, *Aspergillus tamaraii*, *A. westerdijkiae*, *A. charticola*, *A. rutilum*, *Sarocladium strictum*, *Fusarium redolens*, *Cryptococcus aerius*, *Operculomyces laminatus* e *Mortierella elongata*, *Torulaspora*

*delbrueckii* e *Kluyveromyces lactis* totalizando 10,97%. Espécies muito pouco prevalentes também identificadas nesta amostra foram *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Candida parapsilopsis*, *Candida etchelsii*, *Acremonium persicinum*, *Cryptococcus terricola*, *Mortierella exigua*, *Trichoderma piluliferum*, *Minimedusa polyspora*, *Microdochium bolleyi*, *Gibberella intricans*, *Dendryphion nanum*, *Veronaea musae*, *Thelebolus ellipsoideus*, *Rhizophlyctis rosea*, *Metarhizium carneum*, *Cladorrhinum foecundissimum*, *Tetragoniomyces uliginosus*, *Scutellinia crucipila*, *Mucor hiemalis*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Tetracladium furcatum*, *Phaeonectriella lignicola*, *Monographella nivalis*, *Trichosporon dulciturum*, *Atractiella solani*, *Septoriella oudemansii*, e *Saccharomyces cerevisiae* (ANEXO).

## 4 DISCUSSÃO

Por meio de técnicas morfológicas de identificação foi possível perceber uma maior diversidade de fungos filamentos presentes na amostra A4 e maiores populações médias totais na amostra A3 do que nas demais amostras de QMA da microrregião da Serra da Canastra. Com temperatura média da região em torno dos 20 °C, a maturação do queijo no ambiente das queijarias ocorre numa faixa favorável de crescimento para fungos filamentosos e leveduras (MONNET, et al. 2014).

Outra técnica utilizada neste trabalho foi a análise metagenômica das amostras de QMA. Esta análise tem sido amplamente utilizada para explorar amostras ambientais com objetivo traçar um panorama da diversidade microbiana presente no ambiente bem como entender e ampliar o conhecimento destes ecossistemas. Avalia-se que a grande parte dos micro-organismos presentes nestes ambientes não sejam cultiváveis, devido a diversos fatores impossibilitando a reprodução do habitat em laboratório. De fato, essa abordagem é relativamente rápida e oferece a perspectiva de detectar uma diversidade maior de espécies do que a aplicação de métodos usando os meios de cultura clássicos (MERING, et al. 2007; ŠURANSKÁ, et al. 2016). A metagenômica utiliza o DNA presente na amostra, estando esse viável para o cultivo ou não, para comparação no banco de dados. Isso pode justificar a diferença entre os resultados encontrados nas análises realizadas para identificação dos micro-organismos. Sendo assim, fica clara a importância de uma associação de técnicas para o estudo da diversidade, visto que a o isolamento e a identificação a partir do método dependente de cultivo permite a preservação dos isolados para estudos posteriores.

Segundo Rasime, et al. (2005) algumas das espécies como as pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces* sp, *Alternaria*, *Acremonium* e do complexo *Cladosporium cladosporioides*, como as encontradas nas amostras analisadas são fungos filamentosos típicos de solo comumente encontrados em queijos maturados em ambientes como o de caverna. As estirpes de *Geotrichum candidum* (mais prevalente na amostra A1), fungo característico de produtos lácteos, não só fazem parte da microbiota do leite cru como também são encontradas em ambientes diversos como o solo, ervas e silagem. *G. candidum* também pode atuar inibindo o crescimento do fungo filamentoso *Mucor* sp, cujas hifas aéreas são responsáveis pelo defeito de queijo *poil de chat* (pelo de gato) além de inibir a esporulação de certas cepas do fungo filamentoso micotoxigênico *Aspergillus flavus* e espécies indesejáveis de *Penicillium*, como *P. commune* e *P. caseifulvum* (MARCELLINO; BENSON, 2014). Outras espécies identificadas no presente trabalho como *Trichothecium*

*roseum*, fungo filamentoso saprófito e fitopatogênico e *Byssochlamys* sp também são fungos filamentosos mais comumente encontrados em solo (SAMSON, et al. 2010; MARCELLINO; BENSON, 2014). A espécie *Aspergillus tamarii*, identificada neste trabalho, também já foi isolada de queijo maturado (PHILIPPE, et al. 2012; MARCELLINO; BENSON, 2014).

Lavoie, et al. (2012) observaram que em queijos fabricados a partir de leite cru comumente encontram-se os gêneros *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Fusarium*. Flórez e colaboradores (2007) encontraram em queijo Cabrales, um tradicional queijo azul espanhol fabricado com leite cru, através de técnicas morfológicas e moleculares, diferentes cepas de *Penicillium* sp e *Geotrichum candidum*. El-Fadaly, et al. (2015) após analisar amostras de queijo Romy, um tradicional queijo duro artesanal egípcio fabricado a partir de leite de vaca ou LEITE misto de vaca e búfala, identificaram morfológicamente as espécies *Geotrichum candidum*, *Aspergillus ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. nidulans*, *Emericella nidulans*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. flavipes*, *Penicillium* sp, *Mucor* sp e *Rhizopus stolonifer*.

Jodral, et al. (1993) avaliaram fungos filamentosos de leite cru e identificaram como mais frequentes os gêneros *Geotrichum* (76,5%), *Fusarium* (45,3%) e *Aspergillus* (31,2%). Vacheyrou et al. (2011) concluíram que a maioria das espécies de fungos filamentosos encontradas no leite de vaca se origina de uma transferência do estábulo para o campo de ordenha e depois para o leite. Os fungos filamentosos que ocorrem no leite cru ou no ambiente da queijaria não são muito susceptíveis de persistir e/ou crescer no queijo devido à composição bioquímica do queijo e ao efeito de obstáculo exercido pela microbiota do queijo. Estes estudos corroboram com os resultados encontrados neste trabalho e reforça a influência do ambiente na fabricação artesanal visto que, a maioria desses não são micro-organismos relacionados diretamente ao leite, vindo aparecer no queijo durante o período de maturação. O crescimento descontrolado de fungos na superfície de queijos deve ser visto com atenção, sendo importante a seleção de estirpes não toxigênicas, que tragam benefícios e garantam a segurança microbiológica do produto.

Na amostra A3, 8 isolados da espécie *A. ochraceus* de um total de 12 isolados apresentou teste positivo para produção de Ocratoxina A. No entanto, o crescimento de fungos micotoxigênicos na superfície do queijo não implica automaticamente que as micotoxinas estejam presentes no produto (HYMERY, et al. 2014). *P. camemberti* e *P. roqueforti*, amplamente utilizados para maturação de queijos típicos de vários países são espécies conhecidas por sua potencial produção de micotoxinas. No entanto, devido às

práticas de produção e condições de armazenamento, apenas concentrações baixas a muito baixas foram observadas (BULLERMAN, 1981; TEUBER; ENGEL, 1983).

Os principais fatores abióticos responsáveis por modular a produção de micotoxinas no queijo podem ser divididos em fatores ambientais e de manufatura como temperatura, umidade relativa, tempo de maturação e de armazenamento utilizados durante a fabricação do queijo, bem como aspectos físico-químicos do próprio queijo como composição química, pH, atividade de água ( $A_w$ ) e potencial redox. Além disso, podem ocorrer variações no fim da maturação na camada superficial do queijo, como no pH (7,0 para 5,6), no percentual de NaCl (2% para 0,6%) e  $A_w$  (0,98 para 0,95) (HYMERY, et al. 2014).

Não houve grande diferença de diversidade de leveduras entre as amostras de QMA da Serra da Canastra analisadas. *Trichosporon coremiiforme* representou mais da metade das leveduras identificadas, seguida de *Trichosporon japonicum* e *Candida catenulata*. A ocorrência de um número limitado de espécies confirma que o ecossistema do queijo é caracterizado por composição e condições ambientais específicas, que promove a seleção de uma microbiota bem definida (JAKOBSEN; NARVHUS, 1996).

Cardoso, et al. (2015), após avaliar amostras de QMA da microrregião do Serro constatou que as leveduras encontradas em maior quantidade foram *Debaryomyces hansenii*, *Kodamaea ohmeri* e *Kluyveromyces marxianus*. Em outro estudo, Andrade et al. (2017) identificaram em amostras de QMA da Serra da Canastra as leveduras *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspota delbrueckii* e *Candida intermedia*, que mostraram-se importantes para agregar sabor e aroma ao queijo devido a produção de compostos aromáticos voláteis. Borelli, et al. (2006) avaliaram a população de leveduras em QMA da Serra da Canastra e identificaram como mais prevalentes *C. catenulata*, *D. hansenii* e *T. delbrueckii*. *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* foram espécies identificadas por Nobrega, et al (2008) após analisar leveduras presentes no pingo utilizado para fabricação de QMA da Serra da Canastra. Portanto, os resultados apresentados neste trabalho corroboram com os resultados de estudos semelhantes.

Dentre as leveduras identificadas a espécie *C. catenulata* provavelmente desempenha um papel importante na microbiota natural deste queijo. Esta espécie já foi isolada de diferentes queijos produzidos em outros países (CORSETTI; ROSSI; GOBBETTI, 2001). *Debaryomyces hansenii*, espécie pertencente ao gênero identificado nas amostras A1 e A4 *Debaryomyces* mostrou capacidade de adsorção de micotoxinas e de inibição da biossíntese de OTA por *Aspergillus westerdijkiae*, espécie identificada neste trabalho (GIL-SERNA, et al. 2011).

Supõe-se que queijos feitos e maturados nas mesmas regiões geográficas teriam composição microbiana mais similar do que aqueles fabricados em locais mais distantes. No entanto, estudos que avaliaram um conjunto de dados para a Europa e os Estados Unidos mostraram que a composição da comunidade não está significativamente correlacionada com a distância geográfica, justificando então as diferenças de resultados entre estudos de diversidade (WOLFE, et al. 2014).

Embora muitos isolados selecionados não puderam ser identificados por limitações do banco de dados ou da metodologia utilizada para identificação, duas leveduras diferentes das encontradas por Borelli et al. (2006), Cardoso et al. (2015) e Andrade et al. (2017) foram identificadas: *Trichosporon coremiiforme* e *T. japonicum*, ambas já isoladas de solo e/ou excremento de pássaros e que requerem atenção devido à probabilidade de patogenicidade em humanos (MIDDELHOVEN, et al. 2003).

Estes resultados mostram a importância da exploração do potencial biotecnológico das leveduras presentes no QMA responsáveis pela agregação de características sensoriais desejáveis, bem como de selecionar as indesejáveis e possivelmente patogênicas. A simbiose entre a microbiota é de grande importância e precisa ser mais bem investigada.

De acordo com a Portaria nº 146, de 7 de março de 1996, que aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos (BRASIL, 1996), as amostras analisadas são classificadas como queijos de baixa umidade (até 35,9%) ou queijos de massa dura. Segundo o regulamento da Lei 14.185/2002 que trata do QMA, este deve apresentar umidade de no máximo 45,9% (média umidade) (MINAS GERAIS, 2002). Portanto, ambas as amostras analisadas apresentaram percentual de umidade dentro do previsto em legislação. O percentual de umidade mais baixo pode ser explicado pelo maior tempo de maturação empregado na produção das amostras objeto de estudo, visto que a legislação atual estabelece tempo mínimo de maturação de 22 dias para a microrregião da Serra da Canastra e as amostras foram produzidas como tempo de maturação entre 45 e 60 dias.

Com temperatura média da região em torno dos 20 °C, a maturação do queijo no ambiente das queijarias ocorre numa faixa favorável de crescimento para fungos filamentosos e leveduras (MONNET, et al. 2014). Wolfe, et al. (2014) correlacionaram a microbiota e a umidade na casca de queijos maturados e observaram que o crescimento de *Geotrichum candidum* esteve positivamente relacionado com a umidade do queijo, diferentemente dos gêneros *Scopulariopsis* e *Aspergillus*.

Durante a maturação as leveduras e os fungos filamentosos, presentes no queijo, metabolizam o ácido láctico e produzem NH<sub>3</sub>, aumentando assim o pH da superfície (de 4,8 a

5,2 para 6 a 8,2) (MONTEL, et al. 2014). Neste trabalho, as variações dos componentes físico-químicos do leite entre as amostras foram observadas nos percentuais de gorduras, umidade e pH, o que pode justificar a diferença na diversidade de micro-organismos. O percentual de NaCl não diferiu estatisticamente. Na amostra A1 observa-se uma maior ocorrência dos fungos filamentosos *Aspergillus* sp, *Geotrichum candidum*, *Fusarium* sp e *Paecilomyces* sp e da levedura *Candida catenulata*. Os aspectos físico-químicos que estiveram correlacionados com esta amostra foram pH e umidade.

Kure & Skaar (2000) encontraram em duas variedades de queijos noruegueses semi-duros (Jarlsberg e Norvegia) os gêneros de fungos filamentosos *Penicillium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Phoma* e *Ulocladium*. O pH dos queijos analisados variou entre 5,4 e 5,7 e o conteúdo de gorduras esteve entre 16 e 27%. O pH ideal para o crescimento do *G. candidum* é de cerca de 5,5, mas eles podem crescer em valores de pH de 3,5 a 9,0 (ARTEAU; LABRIE; ROY, 2010). Neste sentido, os resultados se assemelham aos resultados apresentados neste trabalho considerando que os valores de pH e alguns dos gêneros de fungos filamentosos foram semelhantes aos encontrados por Kure & Skaar (2000).

Quanto ao percentual de gorduras, apenas a amostra A4 foi classificada como queijo gordo (45,0% a 59,9% de gorduras no extrato seco) de acordo com a Portaria nº 146/1996 e o restante das amostras classificou-se como semigordo (25,0% a 44,9% de gorduras no extrato seco) (BRASIL, 1996). Sendo assim, o percentual de gordura apresenta valores discrepantes comparando-se os dois trabalhos. A amostra A4, mais distinta estatisticamente entre elas, percebeu-se como aspecto físico-químico de mais destaque o percentual de gorduras. Houve uma maior ocorrência dos fungos *Alternaria* sp, *Penicillium* sp, *Trichothecium roseum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* e morfotipo não identificado Sp. Não houve maior correlação estatística desta amostra com as espécies de leveduras identificadas. A diferença estatística desta amostra pode estar no fato de que ela foi a única amostra coletada na cidade de Piumhi. As amostras A1, A2 e A3 foram coletadas na cidade de São Roque de Minas. Isso pode representar que a localização geográfica pode ter alguma influência sobre as características físico-químicas e micológicas do produto.

O crescimento de fungos no queijo é determinado pela sua capacidade de crescer em baixas concentrações de oxigênio, baixo pH e baixa atividade de água ( $A_w$ ). Estes micro-organismos são também, em sua maioria, resistentes à ação conservante dos ácidos graxos

livres e possuem atividade lipolítica que lhes permite causar deterioração no queijo (CHEONG, et al. 2014).

Para a amostra A2 houve uma maior ocorrência das leveduras *Trichosporon japonicum* e *T. coremiiforme*. Não houve maior ocorrência de fungos filamentosos, pois esta amostra não apresentou contaminação dos mesmos a partir da análise morfológica. Quanto às características físico-químicas, o percentual de NaCl mostrou-se correlacionado tanto com a amostra A2 quanto com a amostra A3. Nesta última, apenas o fungo filamentoso *Byssochlamys sp* apresentou maior correlação.

O processo de salga do queijo é feito tanto para adequação de sabor e umidade quanto para inibir o crescimento de patógenos. A maioria dos fungos capazes de crescer em queijo são tolerantes ao sal (NaCl) e podem crescer em condições relativamente baixas de  $A_w$ . Os percentuais de NaCl de ambas das amostras foram semelhantes (0,87 a 0,98%). *G. candidum* (mais prevalente na amostra A1) é sensível ao sal. O crescimento é inibido em 1 a 2% de NaCl e nenhum crescimento é observado em 5%, entretanto a 1% o crescimento é melhor que sem nenhuma adição de sal. Queijos moles como Camembert e Brie têm 1,5 a 2,0% de NaCl. Algumas espécies de *Penicillium* podem tolerar concentrações de 5% de NaCl (MARCELLINO, et al. 2001; HYMERY, et al. 2014).

De acordo com Montel, et al. (2014) a dinâmica das interações microbianas, especialmente complexas em queijos tradicionais, devido à diversidade da composição da microbiota, estão longe de serem elucidadas. O ecossistema microbiano determina e, ao mesmo tempo, é determinado por fatores intrínsecos ao queijo (disponibilidade de substratos e cofatores, presença de compostos inibidores/ativadores, pH e potencial redox) e fatores extrínsecos (disponibilidade de oxigênio, temperatura, umidade relativa). Os processos de fabricação e maturação envolvidos impulsionam toda a dinâmica dos ecossistemas do queijo.

## 5 CONCLUSÃO

A importância de ampliar o conhecimento sobre as características de produtos locais e artesanais tem crescido nos últimos anos e o conhecimento gerado impacta na melhoria das condições de fabricação, bem como corrobora para segurança alimentar do consumidor. Neste contexto, o presente trabalho possibilitou o conhecimento da diversidade de fungos filamentosos e leveduras característicos do *terroir* da microrregião da Serra da Canastra e sua correlação com as características físico-químicas do Queijo Minas Artesanal com maior tempo de maturação.

Das amostras analisadas observou-se uma prevalência das leveduras *Trichosporon japonicum*, *T. coremiiforme*, *Candida catenulata*, *Kodamaea ohmeri*, *Torulaspota delbrueckii* e do gênero *Debaryomyces*. Para os fungos filamentosos prevaleceram os gêneros *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Acremonium* e *Paecilomyces*. Este foi o primeiro trabalho de caracterização da microbiota característica do *terroir* desta região. As espécies identificadas permitiram conhecer mais sobre as comunidades microbianas que se mostraram distintas entre as propriedades produtoras de queijo.

## REFERÊNCIAS

- ALONSO, R. et al. Proteolysis, lipolysis, volatile compounds and sensory characteristics of Hispánico cheeses made using frozen curd from raw and pasteurized ewe milk. **Journal of dairy research**, v. 80, n. 1, p. 51-57. 2013.
- ANDRADE, R. P. et al. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food research international**, v. 91, p. 72-79, 2017.
- ARTEAU, M.; LABRIE, S.; ROY, D. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. **International dairy journal**, v. 20, n. 8, p. 545-554, 2010.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis** of AOAC International. 18 ed. Washington, 2006.
- BEUVIER, E. et al. Raw milk cheeses, Cheese: Chemistry, Physics & Microbiology, 3rd ed., vol. 1. **Elsevier Ltd.**, London, pp. 319–345. 2004.
- BORELLI, B. M. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1115-1119, 2006.
- BULLERMAN, L. B. Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**. 64(12), p. 2439-2452, 1981.
- BRASIL. **Portaria nº 146, de 7 de março de 1996**. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, 1996. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>> Acesso em 03 de junho de 2018.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dez de 2006**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2016/03/Instru%C3%A7%C3%A3o-normativa-n%C2%B0-68-de-12-dezembro-de-2006.pdf>> Acesso em: 29 de maio de 2018.
- BOKULICH, N. A.; MILLS, D. A. Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5214-5223, 2013.
- CARDOSO, V. M. et al. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69, p. 331-340, 2015.
- CHEONG, E. Y. L. et al. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. **Food Control**, v. 46, p. 91-97, 2014.

- CORSETTI, A.; ROSSI, J.; GOBBETTI, M. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. **International journal of food microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 1-10, 2001.
- DOYLE, C. J.; O'TOOLE, P. W.; COTTER, P. D. Metagenome-based surveillance and diagnostic approaches to studying the microbial ecology of food production and processing environments. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 11, p. 4382-4391, 2017.
- EL-FADALY, H. M. et al. Isolation and Identification of Egyptian Ras Cheese (Romy) Contaminating Fungi during Ripening Period. **Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.
- FLÓREZ, B. A. et al. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. **International Dairy Journal**. vol.17(4), p. 350-357, 2007.
- FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Chemistry and biochemistry of cheese and fermented milks. In: \_\_\_\_\_. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. cap. 10, p. 403-418.
- GIL-SERNA, J. et al. Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. **International journal of food microbiology**. v. 151(1), p. 113-118, 2011.
- GOMES, A. P. et al. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. **Journal of Dairy Science**. v. 94(6), p. 2701-2706, 2011.
- HYMERY, N. et al. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. vol.13(4), p. 437-456, 2014.
- JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International dairy journal**, v. 6, n. 8-9, p. 755-768, 1996.
- JODRAL, M. et al. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. **International journal of food microbiology**, v. 18, n. 2, p. 171-174, 1993.
- KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: CBS, 2002. 116 p.
- KURE, C. F.; SKAAR, I. Mould growth on the Norwegian semi-hard cheeses Norvegia and Jarlsberg. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 133-137, 2000.

LAVOIE, K. et al. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. **Dairy science & technology**, 92(5), 455-468, 2012.

MERING, C. et al. Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. **Science**. v. 315, p. 1126-1130, 2007.

MINAS GERAIS. **Lei n. 14.185, de 31 de jan. de 2002**. Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e da outras providencias. Belo Horizonte, MG, 2002a. Disponível em: <[http://ns.ima.mg.gov.br/intranet/nova/gce/outros\\_documentos/42645.pdf](http://ns.ima.mg.gov.br/intranet/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf)> Acesso em: 29 de maio de 2018.

MARCELLINO, N. et al. Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France. **Appl Environ Microbiol**. 67(10) p. 4752-4759, 2001.

MARCELLINO, N.; BENSON, D. R. The good, the bad, and the ugly: tales of mold-ripened cheese. In: Cheese and Microbes. **American Society of Microbiology**, p. 95-131, 2014.

MIDDELHOVEN, W. J. Identification of clinically relevant *Trichosporon* species. **Mycoses**, v. 46, n. 1-2, p. 7-11, 2003.

MOHAMED, S. et al. An estension of the coconut cream agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production. **Journal of Applied Mibrobiology**, Hoboken, v. 57, p. 214-219, 2013.

MONNET, C. et al. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 263, No. 1, 2014.

MONTEL, M. C. et al. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. **International journal of food microbiology**, v. 177, p. 136-154, 2014.

NÓBREGA, J. E. et al. Variações na microbiota leveduriforme do fermento endógeno utilizado na produção do queijo Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 364, p. 14-18, 2008.

NÓBREGA, J. E. **Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais**. 128 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102-110, 2015.

PHILIPPE, S. et al. Chemical Composition and Antifungal activity of Essential oil of Fresh leaves of *Ocimum gratissimum* from Benin against six Mycotoxigenic Fungi isolated from traditional cheese wagashi. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 22-27, 2012.

PINHEIRO, A. C. M.; NUNES, C. A.; VIETORIS, V. SensoMaker: a tool for sensorial characterization of food products. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 3, p. 199-201, 2013.

PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Sydney. Food Science Australia, 187 p. 2000.

RASIME, D. et al. Microfungi in cultivated fields in Eskişehir province (Turkey) **Journal of Basic Microbiology**. vol.45(4), p. 279-293, 2005.

RESENDE, L. V. et al. Microbial community and physicochemical dynamics during the production of 'Chicha', a traditional beverage of Indigenous people of Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 46, 2018.

SANSOM, A. et al. **Introduction to food-bourne fungi**. Centraalbureau voor schimmelcultures. Baarn and Delft. 4th ed. 2000.

SAMSON, R. A. et al. **Food and indoor fungi**. CBS laboratory manual series 2. **CBS-Fungal Biodiversity Centre**, 2010.

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

ŠURANSKÁ, H. et al. Characterisation of the yeast and mould biota in traditional white pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques. **Folia microbiologica**, v. 61, n. 6, p. 455-463. 2016.

TEUBER, M.; ENGEL, G. Low risk of mycotoxin production in cheese. **Microbiol. Alim. Nutr**, 1, p. 193-197, 1983.

VACHEYROU, M. et al. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. **International journal of food microbiology**, v. 146, n. 3, p. 253-262, 2011.

WOLFE, B. E. et al. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. **Cell**, vol. 158, p. 422-33, 2014.

## ANEXOS

Micobiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) continua

Microorganismo	Amostra	Cidade/Região	UTOs	Ano
<i>Fusarium</i> sp	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	285	2016
<i>Fusarium</i> sp	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	283	2016
<i>Fusarium</i> sp	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	9.519	2017
<i>Fusarium</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	4.341	2017
<i>Fusarium</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	28.72	2017
<i>Fusarium</i> sp	A4	Piumhi – MG/Canastra	14.210	2017
<i>Fusarium redolens</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	27	2016
<i>Fusarium redolens</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	33	2016
<i>Fusarium redolens</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	12	2017
<i>Fusarium redolens</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	7	2017
<i>Fusarium redolens</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	13	2017
<i>Fusarium redolens</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	5	2017
<i>Fusarium oxysporum</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	12	2016
<i>Fusarium oxysporum</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	14	2016
<i>Fusarium oxysporum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	4	2017
<i>Fusarium oxysporum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Fusarium oxysporum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	7	2017
<i>Fusarium oxysporum</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	4	2017
<i>Fusarium solani</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	3	2016
<i>Fusarium solani</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	1	2016
<i>Fusarium solani</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Fusarium solani</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Fusarium solani</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	1	2017
<i>Kodamaea ohmeri</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	7.453	2016
<i>Kodamaea ohmeri</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	11.558	2017

Microbiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) continua

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cidade/Região</b>	<b>UTOs</b>	<b>Ano</b>
<i>Candida</i> sp	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	887	2016
<i>Candida</i> sp	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	69	2016
<i>Candida</i> sp	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Candida</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Candida</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Candida</i> sp	A4	Piumhi – MG/Canastra	3	2017
<i>Candida catenulata</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	12.019	2016
<i>Candida catenulata</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	6.340	2017
<i>Candida parapsilopsis</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	1	2016
<i>Candida parapsilopsis</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	5	2017
<i>Candida parapsilopsis</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	10	2017
<i>Candida parapsilopsis</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	6	2017
<i>Candida etchelsii</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	5	2016
<i>Candida etchelsii</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Cladosporium</i> sp	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	14	2016
<i>Cladosporium</i> sp	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	23	2016
<i>Cladosporium</i> sp	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Cladosporium</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	4	2017
<i>Cladosporium</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Cladosporium</i> sp	A4	Piumhi – MG/Canastra	3	2017
<i>Acremonium citrinum</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	44	2016
<i>Acremonium citrinum</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	162	2016
<i>Acremonium citrinum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	192	2017
<i>Acremonium citrinum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	66	2017
<i>Acremonium citrinum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	613	2017
<i>Acremonium citrinum</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	5.711	2017
<i>Acremonium charticola</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	6	2016
<i>Acremonium charticola</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	46	2017

Microbiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) continua

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cidade/Região</b>	<b>UTOs</b>	<b>Ano</b>
<i>Acremonium rutilum</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	11	2016
<i>Acremonium rutilum</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	18	2016
<i>Acremonium rutilum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	5	2017
<i>Acremonium rutilum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Acremonium rutilum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Acremonium persicinum</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	2	2016
<i>Acremonium persicinum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Acremonium persicinum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Acremonium persicinum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Alternaria</i> sp	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	4	2016
<i>Alternaria</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Alternaria</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Trichosporon</i> sp	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	141	2016
<i>Trichosporon</i> sp	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	15.763	2016
<i>Trichosporon</i> sp	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	145	2017
<i>Trichosporon</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	17.827	2017
<i>Trichosporon</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	92	2017
<i>Trichosporon</i> sp	A4	Piumhi – MG/Canastra	102	2017
<i>Trichosporon dulciturum</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	5	2016
<i>Trichosporon dulciturum</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	5	2016
<i>Trichosporon dulciturum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Trichosporon dulciturum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Trichosporon dulciturum</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	2	2017
<i>Debaryomyces</i> sp	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	20	2016
<i>Debaryomyces</i> sp	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	2.004	2016
<i>Debaryomyces</i> sp	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	582	2017
<i>Debaryomyces</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	30	2017
<i>Debaryomyces</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	36	2017

Micobiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) continua

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cidade/Região</b>	<b>UTOs</b>	<b>Ano</b>
<i>Debaryomyces</i> sp	A4	Piumhi – MG/Canastra	4.149	2017
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	86	2016
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	2.281	2016
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	146	2017
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	610	2017
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	3	2017
<i>Kluyveromyces lactis</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	38	2016
<i>Kluyveromyces lactis</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	1.171	2016
<i>Kluyveromyces lactis</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Kluyveromyces lactis</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	417	2017
<i>Kluyveromyces lactis</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	80	2017
<i>Kluyveromyces lactis</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	3	2017
<i>Microascus brevicaulis</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	124	2016
<i>Microascus brevicaulis</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	45	2016
<i>Microascus brevicaulis</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	771	2017
<i>Microascus brevicaulis</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Microascus brevicaulis</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Aspergillus</i> sp	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	2	2016
<i>Aspergillus</i> sp	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	14	2016
<i>Aspergillus</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Aspergillus</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	127	2017
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	2	2016
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	20	2016
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	303	2017
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	1	2016

Micobiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) continua

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cidade/Região</b>	<b>UTOs</b>	<b>Ano</b>
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	1	2016
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	39	2017
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	182	2016
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	194	2016
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	64	2017
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	40	2017
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	65	2017
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	14	2017
<i>Neosetophoma samarosum</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	110	2016
<i>Neosetophoma samarosum</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	66	2016
<i>Neosetophoma samarosum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	26	2017
<i>Neosetophoma samarosum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	15	2017
<i>Neosetophoma samarosum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	27	2017
<i>Neosetophoma samarosum</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	13	2017
<i>Nectria bactridioides</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Nectria bactridioides</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	66	2017
<i>Emericellopsis</i> sp	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	8	2016
<i>Emericellopsis</i> sp	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	16	2016
<i>Emericellopsis</i> sp	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Emericellopsis</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Emericellopsis</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Emericellopsis</i> sp	A4	Piumhi – MG/Canastra	3	2017
<i>Cryptococcus aerius</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	42	2016
<i>Cryptococcus aerius</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	54	2016
<i>Cryptococcus aerius</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	26	2017
<i>Cryptococcus aerius</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	16	2017
<i>Cryptococcus aerius</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	19	2017
<i>Cryptococcus aerius</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	7	2017

Microbiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) continua

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cidade/Região</b>	<b>UTOs</b>	<b>Ano</b>
<i>Cryptococcus terricola</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	1	2016
<i>Cryptococcus terricola</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	1	2016
<i>Cryptococcus terricola</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Cryptococcus terricola</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Cryptococcus terricola</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	1	2017
<i>Exophiala salmonis</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	29	2016
<i>Exophiala salmonis</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	30	2016
<i>Exophiala salmonis</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	17	2017
<i>Exophiala salmonis</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	7	2017
<i>Exophiala salmonis</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	12	2017
<i>Exophiala salmonis</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	13	2017
<i>Mortierella</i> sp	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	13	2016
<i>Mortierella</i> sp	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	10	2016
<i>Mortierella</i> sp	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	4	2017
<i>Mortierella</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	5	2017
<i>Mortierella</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Mortierella</i> sp	A4	Piumhi – MG/Canastra	2	2017
<i>Mortierella enlongata</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	52	2016
<i>Mortierella enlongata</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	55	2016
<i>Mortierella enlongata</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	17	2017
<i>Mortierella enlongata</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	14	2017
<i>Mortierella enlongata</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	23	2017
<i>Mortierella enlongata</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	7	2017
<i>Mortierella exigua</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	9	2016
<i>Mortierella exigua</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	9	2016
<i>Mortierella exigua</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Mortierella exigua</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	5	2017
<i>Mortierella exigua</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	1	2017

Microbiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) continua

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cidade/Região</b>	<b>UTOs</b>	<b>Ano</b>
<i>Kazachstania unispora</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	45	2016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	1	2016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	9	2016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	6	2017
<i>Trichoderma</i> sp	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	20	2016
<i>Trichoderma</i> sp	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	21	2016
<i>Trichoderma</i> sp	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	7	2017
<i>Trichoderma</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	7	2017
<i>Trichoderma</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	8	2017
<i>Trichoderma</i> sp	A4	Piumhi – MG/Canastra	5	2017
<i>Trichoderma piluliferum</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	1	2016
<i>Trichoderma piluliferum</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	2	2016
<i>Trichoderma piluliferum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Trichoderma piluliferum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Trichoderma piluliferum</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	1	2017
<i>Minimedusa polyspora</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	7	2016
<i>Minimedusa polyspora</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	11	2016
<i>Minimedusa polyspora</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	7	2017
<i>Minimedusa polyspora</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Minimedusa polyspora</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Minimedusa polyspora</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	5	2017
<i>Microdochium bolleyi</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	8	2016
<i>Microdochium bolleyi</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	14	2016
<i>Microdochium bolleyi</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Microdochium bolleyi</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	4	2017
<i>Microdochium bolleyi</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	2	2017
<i>Sarocladium strictum</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	15	2016
<i>Sarocladium strictum</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	8	2016

Micobiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) continua

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cidade/Região</b>	<b>UTOs</b>	<b>Ano</b>
<i>Sarocladium strictum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Sarocladium strictum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	5	2017
<i>Sarocladium strictum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	6	2017
<i>Sarocladium strictum</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	4	2017
<i>Gibberella intricans</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	7	2016
<i>Gibberella intricans</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	13	2016
<i>Gibberella intricans</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Gibberella intricans</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Gibberella intricans</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	4	2017
<i>Gibberella intricans</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	3	2017
<i>Dendryphion nanum</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	3	2016
<i>Dendryphion nanum</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	6	2016
<i>Dendryphion nanum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Dendryphion nanum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Dendryphion nanum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Operculomyces laminatus</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	14	2016
<i>Operculomyces laminatus</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	44	2016
<i>Operculomyces laminatus</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Operculomyces laminatus</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	13	2017
<i>Operculomyces laminatus</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Veronaea musae</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	6	2016
<i>Veronaea musae</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	5	2016
<i>Veronaea musae</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Veronaea musae</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Veronaea musae</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	5	2017
<i>Penicillium sp</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	9	2017
<i>Thelebolus ellipsoideus</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	3	2016
<i>Thelebolus ellipsoideus</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	2	2016

Micobiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) continua

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cidade/Região</b>	<b>UTOs</b>	<b>Ano</b>
<i>Thelebolus ellipsoideus</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	6	2017
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	12	2016
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	2	2016
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Metarhizium carneum</i>	A1 verão/úmido	Serro – MG/Serro	6	2016
<i>Metarhizium carneum</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	4	2016
<i>Metarhizium carneum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Metarhizium carneum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Metarhizium carneum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Cladorrhinum foecundissimum</i>	A1 verão/úmido	Serro - MG/Serro	3	2016
<i>Cladorrhinum foecundissimum</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	1	2016
<i>Cladorrhinum foecundissimum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Cladorrhinum foecundissimum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Cladorrhinum foecundissimum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Tetragoniomyces uliginosus</i>	A1 verão/úmido	Serro - MG/Serro	1	2016
<i>Tetragoniomyces uliginosus</i>	A2 inverno/seco	Serro – MG/Serro	10	2016
<i>Tetragoniomyces uliginosus</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Tetragoniomyces uliginosus</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Tetragoniomyces uliginosus</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Scutellinia</i> sp	A1 verão/úmido	Serro - MG/Serro	2	2016
<i>Scutellinia</i> sp	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Scutellinia</i> sp	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Scutellinia</i> sp	A4	Piumhi – MG/Canastra	1	2017
<i>Scutellinia crucipila</i>	A1 verão/úmido	Serro - MG/Serro	2	2016
<i>Scutellinia crucipila</i>	A2 inverno/seco	Serro - MG/Serro	2	2016
<i>Scutellinia crucipila</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Scutellinia crucipila</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017

Micobiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) continua

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cidade/Região</b>	<b>UTOs</b>	<b>Ano</b>
<i>Scutellinia crucipila</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	1	2017
<i>Mucor</i> sp	A1 verão/úmido	Serro - MG/Serro	2	2016
<i>Mucor</i> sp	A2 inverno/seco	Serro - MG/Serro	5	2016
<i>Mucor</i> sp	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Mucor</i> sp	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	4	2017
<i>Mucor hiemalis</i>	A2 inverno/seco	Serro - MG/Serro	2	2016
<i>Mucor hiemalis</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Mucor hiemalis</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Monographella nivalis</i>	A1 verão/úmido	Serro - MG/Serro	5	2016
<i>Monographella nivalis</i>	A2 inverno/seco	Serro - MG/Serro	3	2016
<i>Monographella nivalis</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Monographella nivalis</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Monographella nivalis</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Monographella nivalis</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	1	2017
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	A1 verão/úmido	Serro - MG/Serro	2	2016
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	A2 inverno/seco	Serro - MG/Serro	4	2016
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	1	2017
<i>Tetracladium furcatum</i>	A1 verão/úmido	Serro - MG/Serro	2	2016
<i>Tetracladium furcatum</i>	A2 inverno/seco	Serro - MG/Serro	5	2016
<i>Tetracladium furcatum</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Tetracladium furcatum</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Tetracladium furcatum</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Phaeoectriella lignicola</i>	A1 verão/úmido	Serro - MG/Serro	2	2016
<i>Phaeoectriella lignicola</i>	A2 inverno/seco	Serro - MG/Serro	3	2016
<i>Phaeoectriella lignicola</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017

Micobiota *terroir* avaliada por método independente de cultivo das microrregiões do Serro e Serra da Canastra (Anos de 2016 e 2017) conclusão

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cidade/Região</b>	<b>UTOs</b>	<b>Ano</b>
<i>Phaeoectriella lignicola</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Septoriella oudemansii</i>	A2 inverno/seco	Serro - MG/Serro	2	2016
<i>Septoriella oudemansii</i>	A3	São Roque de Minas – MG/Canastra	3	2017
<i>Atractiella solani</i>	A2 inverno/seco	Serro - MG/Serro	4	2016
<i>Atractiella solani</i>	A1	São Roque de Minas – MG/Canastra	2	2017
<i>Atractiella solani</i>	A2	São Roque de Minas – MG/Canastra	1	2017
<i>Atractiella solani</i>	A4	Piumhi – MG/Canastra	1	2017
<i>Rhizopus arrhizus</i>	A2 inverno/seco	Serro - MG/Serro	5	2016