



**THALISSA PRADO DE SOUZA**

**CONTROLE DE *Aspergillus ochraceus* POR *Geotrichum candidum* E LEVEDURAS AUTÓCTONES: IMPACTO NA QUALIDADE E SEGURANÇA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL**

**LAVRAS - MG**

**2023**



**THALISSA PRADO DE SOUZA**

**CONTROLE DE *Aspergillus ochraceus* POR *Geotrichum candidum* E LEVEDURAS  
AUTÓCTONES: IMPACTO NA QUALIDADE E SEGURANÇA DO QUEIJO MINAS  
ARTESANAL**

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

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2023**

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

Souza, Thalissa Prado de.

Controle de *Aspergillus ochraceus* por *Geotrichum candidum* e  
leveduras autóctones: Impacto na qualidade e segurança do Queijo  
Minas Artesanal / Thalissa Prado de Souza. - 2023.

75 p. : il.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.  
Bibliografia.

1. Fungos autóctones no biocontrole. 2. Meio de cultura à base  
de queijo. 3. Fungo ocratoxigênico. I. Batista, Luís Roberto. II.  
Título.

**THALISSA PRADO DE SOUZA**

**CONTROLE DE *Aspergillus ochraceus* POR *Geotrichum candidum* E LEVEDURAS  
AUTÓCTONES: IMPACTO NA QUALIDADE E SEGURANÇA DO QUEIJO MINAS  
ARTESANAL**

**CONTROL OF *Aspergillus ochraceus* BY *Geotrichum candidum* AND  
AUTOCHTHONOUS YEASTS: IMPACT ON THE QUALITY AND SAFETY OF MINAS  
ARTESANAL CHEESE**

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

Aprovada em 28 de setembro de 2023.

Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Jaqueline de Paula Rezende	UFLA
Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	UFLA
Dr <sup>ª</sup> . Sara Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

**LAVRAS-MG**

**2023**

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

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, por iluminar meu caminho e me abençoar com essa vitória.

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

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e aos Departamentos de Biologia e Ciência dos Alimentos, pela oportunidade e suporte na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela concessão da bolsa de doutorado. À FAPEMIG e ao CNPq.

Ao NETAX por ter me dado a oportunidade de aprender e ensinar sobre os fungos.

Aos professores e funcionários da UFLA pelos ensinamentos e auxílio.

Ao professor Luís Roberto Batista pela oportunidade e orientação.

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

Ao Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos e a Unidade de Recursos Microbiológicos, por todo o suporte e apoio na execução dos experimentos.

A todos os meus amigos, pelo ombro amigo que sempre dispuseram quando precisei. Em especial à Daniela Domingos pelos grandes momentos compartilhados e por tornar essa jornada mais agradável.

Às companheiras dessa jornada Fabiana Lima, Lucy, Nádja, Giovana, Kátia, Miriam e Cristiane pela amizade, ajuda e boas risadas nos cafés da tarde.

## RESUMO

O Queijo Minas Artesanal (QMA), tem destaque internacional para a produção de queijos, reconhecido pelo concurso *Mondial du Fromage et des Produits Laitiers*. Este queijo é produzido de forma tradicional e a maturação ocorre em prateleiras de madeira, explorando a microbiota que ocorre naturalmente no ambiente. Os fungos autóctones que colonizam são em maioria benéficos e atribuem características sensoriais importantes, bem como potencial bioprotetor. No entanto, espécies ocratoxigênicas indesejáveis, como *Aspergillus ochraceus* pode se desenvolver. Entretanto, o crescimento não implica que a ocratoxina A (OTA) esteja presente no produto, uma vez que sua biossíntese é multifatorial. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos avaliar a influência da atividade água ( $a_w$ ) e temperatura no crescimento e risco potencial de produção de OTA (ORI) por *A. ochraceus* URMICRO 11727 e 11728 em meio à base de queijo, bem como avaliar a eficiência de fungos autóctones no controle do crescimento de *A. ochraceus* URMICRO 11727 e risco ORI. Foi empregado o Delineamento Rotacional Composto Central (DCCR) com  $a_w$  variando de 0,90 a 0,99 e temperaturas de 15 a 35 °C. O crescimento ideal para as cepas de *A. ochraceus* foi entre 0,94 a 0,99  $a_w$  e temperatura entre 23 e 32 °C. As condições sob as quais as cepas mostraram o maior risco ORI, foram em  $a_w$  acima de 0,93 e temperatura entre 18 e 30 °C. Além disso, observou-se que a condição 18°C e 0,98  $a_w$  requer maior atenção, pois corresponde a  $a_w$  do queijo no processo inicial da maturação do QMA. A partir destes resultados, selecionamos três condições (0,95  $a_w$  / 25 °C, 0,98  $a_w$  / 18 °C e 0,99  $a_w$  / 25 °C) nas quais a cepa de *A. ochraceus* URMICRO 11727 apresentou o maior risco ORI, a fim de avaliar o efeito antagonista de fungos autóctones. Os resultados mostraram que todas as seis espécies autóctones testadas exerceram efeito antagonista no co-cultivo. As maiores taxas de inibição foram encontradas empregando *Geotrichum candidum* como espécie antagonista, com 88,37% e 100% de redução nas condições 0,98  $a_w$  / 18 °C e 0,99  $a_w$  / 25 °C, respectivamente. O risco ORI também foi significativamente reduzido, com destaque para *Yarrowia lipolytica*, que inibiu completamente ORI em todas as condições avaliadas. O efeito de compostos orgânicos voláteis (COVs) e solúveis produzidos pelas espécies antagonistas foi avaliado. Observamos a redução do crescimento e da esporulação de *A. ochraceus* pela produção de COVs, com destaque para *G. candidum*, que exerceu efeito fungicida nas condições 0,98  $a_w$  / 18 °C e 0,99  $a_w$  / 25 °C. A inibição do crescimento de *A. ochraceus* provavelmente foi baseado em efeitos sinérgicos de fatores como a competição por nutrientes e espaço e produção de COVs. Os principais COVs com propriedades antifúngicas já relatadas foram 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e 2-feniletanol, conforme detectado pela análise de Headspace-Microextração em Fase Sólida acoplada à Cromatografia Gasosa com detector de Espectrometria de Massas (HS-SPME-GC-MS). Conclui-se que a presença de espécies autóctones no QMA confere proteção, sem alterar a tipicidade do produto.

**Palavras-chave:** Queijo artesanal. Fungo micotoxigênico. Ocratoxina A. Biocontrole. Fatores abióticos.

## ABSTRACT

Queijo Minas Artesanal (QMA) has international prominence for cheese production, recognized by the *Mondial du Fromage et des Produits Laitiers* competition. This cheese is produced in a traditional way and maturation takes place on wooden shelves, exploiting the mycobiota that naturally occurs in the environment. The autochthonous fungi that colonize are mostly beneficial and provide important sensory characteristics, as well as bioprotective potential. However, undesirable ochratoxigenic species such as *Aspergillus ochraceus* may develop. However, growth does not imply that ochratoxin A (OTA) is present in the product, since its biosynthesis is multifactorial. In this sense, the present study aimed to evaluate the influence of water activity ( $a_w$ ) and temperature on the growth and potential risk of OTA production (ORI) by *A. ochraceus* URMICRO 11727 and 11728 in a cheese-based medium, as well as to evaluate the efficiency of autochthonous fungi in controlling the growth of *A. ochraceus* URMICRO 11727 and ORI risk. The Central Composite Rotational Design (DCCR) was used with  $a_w$  varying from 0.90 to 0.99 and temperatures from 15 to 35 °C. The ideal growth for *A. ochraceus* strains was between 0.94 and 0.99  $a_w$  and temperature between 23 and 32 °C. The conditions under which the strains showed the highest ORI risk were  $a_w$  above 0.93 and temperature between 18 and 30 °C. Furthermore, it was observed that the condition 18 °C and 0.98  $a_w$  requires greater attention, as it corresponds to the  $a_w$  of the cheese in the initial process of QMA maturation. From these results, we selected three conditions (0.95  $a_w$  / 25 °C, 0.98  $a_w$  / 18 °C and 0.99  $a_w$  / 25 °C) in which the *A. ochraceus* strain URMICRO 11727 presented the highest risk ORI, in order to evaluate the antagonistic effect of autochthonous fungi. The results showed that all six native species tested exerted an antagonistic effect on co-cultivation. The highest inhibition rates were found using *Geotrichum candidum* as the antagonist species, with 88.37% and 100% reduction under conditions 0.98  $a_w$  / 18 °C and 0.99  $a_w$  / 25 °C, respectively. The ORI risk was also significantly reduced, with emphasis on *Yarrowia lipolytica*, which completely inhibited ORI in all conditions evaluated. The effect of volatile organic compounds (VOCs) and soluble substances produced by antagonistic species was evaluated. We observed a reduction in the growth and sporulation of *A. ochraceus* due to the production of VOCs, with emphasis on *G. candidum*, which exerted a fungicidal effect under conditions 0.98  $a_w$  / 18 °C and 0.99  $a_w$  / 25 °C. The growth inhibition of *A. ochraceus* was probably based on synergistic effects of factors such as competition for nutrients and space and production of VOCs. The main VOCs with antifungal properties already reported were 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol and 2-phenylethanol, as detected by Headspace-Solid Phase Microextraction analysis coupled to Gas Chromatography with a Mass Spectrometry detector (HS-SPME-GC-MS). It is concluded that the presence of autochthonous species in the QMA confers protection, without altering the typicality of the product.

**Keywords:** Artisan cheese. Mycotoxigenic fungus. Ochratoxin A. Biocontrol. Abiotic factors.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>9</b>
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
2.	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
2.1	<b>Regiões produtoras de Queijo Minas Artesanal</b> .....	<b>12</b>
2.2	<b>Processo de produção e maturação do Queijo Minas Artesanal</b> .....	<b>13</b>
2.3	<b>Fungos micotoxigênicos encontrados em queijos e os fatores que influenciam na produção das micotoxinas</b> .....	<b>16</b>
2.4	<b>Ocratoxina A: caracterização, regulação, ocorrência e limites máximos de ingestão</b> .....	<b>19</b>
2.5	<b>Técnicas para determinação de compostos orgânicos voláteis e micotoxinas.</b> .....	<b>21</b>
2.6	<b>Prevenção e controle de fungos micotoxigênicos em alimentos</b> .....	<b>25</b>
3.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	<b>37</b>
	<b>ARTIGO 1 - Influência da temperatura e da atividade de água no crescimento e risco de produção de Ocratoxina A por <i>Aspergillus ochraceus</i> em meio sintético de queijo</b> .....	<b>37</b>
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>38</b>
2.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
2.1	<b>Cepas fúngicas</b> .....	<b>39</b>
2.2	<b>Delineamento rotacional composto central (DCCR)</b> .....	<b>39</b>
2.3	<b>Preparo do meio ágar queijo</b> .....	<b>40</b>
2.4	<b>Reativação dos isolados e inoculação em ágar queijo</b> .....	<b>40</b>
2.5	<b>Avaliação do crescimento fúngico e quantificação de OTA</b> .....	<b>40</b>
2.6	<b>Cálculo do índice de risco ORI</b> .....	<b>41</b>
3.	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
3.1	<b>Efeito da temperatura e <math>a_w</math> na taxa de crescimento</b> .....	<b>42</b>
3.2	<b>Efeito da temperatura e <math>a_w</math> no índice de risco OTA (ORI)</b> .....	<b>44</b>
4.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
5.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>
	<b>ARTIGO 2 - O papel dos fungos autóctones na inibição do crescimento de <i>Aspergillus ochraceus</i> e redução do risco de produção de Ocratoxina A no Queijo Minas Artesanal</b> .....	<b>53</b>
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>54</b>

<b>2.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
<b>2.1</b>	<b>Cepas fúngicas .....</b>	<b>56</b>
<b>2.2</b>	<b>Preparo do meio ágar queijo .....</b>	<b>56</b>
<b>2.3</b>	<b>Reativação dos isolados e co-cultivo em ágar queijo.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4</b>	<b>Avaliação da inibição do crescimento de <i>A. ochraceus</i> e quantificação de OTA .....</b>	<b>57</b>
<b>2.5</b>	<b>Cálculo do índice de risco ORI.....</b>	<b>58</b>
<b>2.6</b>	<b>Avaliação dos mecanismos de controle por fungos autóctones em <i>A.</i> <i>ochraceus</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Ensaio de inibição radial.....</b>	<b>58</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Efeito antifúngico de Compostos orgânicos voláteis (COVs) .....</b>	<b>59</b>
<b>2.7</b>	<b>Identificação de COVs por GC-MS .....</b>	<b>59</b>
<b>2.8</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>60</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>Efeito dos fungos autóctones no crescimento e risco ORI de <i>A. ochraceus</i>..</b>	<b>60</b>
<b>3.2</b>	<b>Efeito antifúngico de compostos produzidos por fungos autóctones no crescimento de <i>A. ochraceus</i> .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Ensaio de inibição radial.....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Avaliação do efeito antifúngico de COVs.....</b>	<b>64</b>
<b>3.3</b>	<b>Identificação dos COVs.....</b>	<b>65</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

Os queijos são reconhecidamente importantes nos diferentes setores agroindustriais e em diferentes países do mundo. No Brasil Minas Gerais é considerado o principal Estado produtor (BEMFEITO et al., 2016; MARTINS et al., 2015), com destaque internacional para produção do Queijo Minas Artesanal (QMA), reconhecido pelo concurso *Mondial du Fromage et des Produits Laitiers* na França (EM, 2017; FIEMG, 2019; G1, 2021). Este queijo é produzido empregando-se leite cru de vaca, sem tratamento térmico prévio, acrescido de coalho, sal, fermento endógeno natural (pingo), e finalmente maturado em prateleiras de madeira. Ao longo da maturação ocorre o desenvolvimento de uma diversidade de fungos importantes para a qualidade das características sensoriais do produto. Fungos como *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida catenulata* e *Candida zeylanoides*, fazem parte da microbiota prevalente atrelada à tipicidade do QMA (DE SOUZA et al., 2021; ARAGÃO et al., 2022).

O sabor e aroma do queijo são atribuídos à um equilíbrio complexo entre diversos compostos voláteis e não voláteis, que refletem nas características finais do produto (PADILLA et al., 2014). Os compostos voláteis aromáticos incluem álcoois, ácidos, ésteres, aldeídos e cetonas; e as substâncias de sabor não voláteis são principalmente ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares redutores, nucleotídeos e polipeptídeos. A presença destes compostos é associada a diferentes fatores durante a produção do queijo, incluindo clima, condições regionais, condições de maturação e ainda pelo metabolismo da microbiota autóctone associada (ZHENG et al., 2021). Fungos que se desenvolvem no queijo artesanal, fornecem sabor e aroma característicos devido à degradação de lipídeos e proteínas, sendo, portanto, benéficos para a qualidade sensorial (CAMARDO LEGGIERI et al., 2020).

Estudos caracterizando a diversidade micológica presente na casca do QMA foram importantes e demonstraram que os fungos são indispensáveis para a qualidade e segurança do produto (DE SOUZA et al., 2021; ARAGÃO et al., 2022). A partir destes registros científicos, recentemente o Queijo Minas Artesanal de Casca Florida (QMACF), uma variedade do QMA, foi reconhecido para comercialização, inicialmente pela presença de *G. candidum* como espécie dominante (MINAS GERAIS, 2022).

Pelo fato dos queijos serem produzidos de forma artesanal, espécies fúngicas indesejáveis podem colonizar o produto. A contaminação em queijos artesanais por fungos

toxigênicos, principalmente durante a fabricação, maturação ou armazenamento, é uma preocupação constante (ANELLI et al., 2019; ONMAZ et al., 2021). Espécies micotoxigênicas como *Aspergillus flavus* potencial produtor de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (DE SOUZA et al., 2021) e *Aspergillus ochraceus* potencial produtor de ocratoxina A (OTA) (ARAGÃO et al., 2022), já foram relatadas em amostras de QMA. Entretanto, o crescimento dessas espécies não implica, necessariamente, que a micotoxina esteja presente no produto. A biossíntese de micotoxinas é modulada por uma diversidade de fatores ecofisiológicos, como a composição do substrato, cepa fúngica, fatores abióticos, tais como temperatura, atividade de água (a<sub>w</sub>), pH, entre outros (HYMERY et al., 2014; CASQUETE et al., 2017; CASQUETE et al., 2018).

Até o momento, não há estudos avaliando a influência de fatores ecofisiológicos sobre o crescimento e a produção de OTA *in vitro*, por cepas de *A. ochraceus* obtidas a partir de queijos artesanais do Brasil. Compreender como os fatores abióticos modulam o desenvolvimento desta espécie e a biossíntese de OTA em condições que simulam a maturação do queijo, permitirá prever estratégias de controle para evitar a contaminação do produto e, conseqüentemente, garantir a produção de um queijo seguro para o consumo.

Há relatos de que a presença de certos microrganismos concorrentes restringe o crescimento de fungos micotoxigênicos e a produção de micotoxinas (SENGUN, 2008), seja por mecanismos de competição por nutrientes e espaço, ou produzindo certos compostos orgânico voláteis (COVs) ou solúveis (NÚÑEZ et al., 2015; MOOKHERJEE et al., 2018; NAZ et al., 2013). De fato, espécies fúngicas autóctones encontradas em queijos artesanais, inclusive no QMA, como *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida zeylanoides* e *Candida catenulata* (BANJARA et al., 2015; BORELLI et al., 2006; CARDOSO et al., 2015; FADDA et al., 2004; LOPANDIC et al., 2006; DE SOUZA et al., 2021; ARAGÃO et al., 2022) apresentam potencial bioprotetor em diferentes substratos e condições, capaz de inibir fungos deteriorantes e / ou micotoxigênicos (DECKER, 2005; GHANBARI et al., 2019; MEDINA-CÓRDOVA et al., 2018; MOOKHERJEE et al., 2018; NILSEN, 1998; NÚÑEZ et al., 2015; VIRGILI et al., 2012; YANG et al., 2016).

Diante da possibilidade de crescimento de fungos micotoxigênicos em queijos artesanais, é fundamental estimular o desenvolvimento de espécies autóctones benéficas, que além de desenvolverem características sensoriais, possam inibir o desenvolvimento de espécies micotoxigênicas, sem alterar o sabor típico do produto (BIAGIOTTI et al., 2018).

Pouco se sabe sobre o papel exercido pela microbiota autóctone em QMA, enquanto bioprotetores naturais do *terroir*. Estudos que permitem avaliar o seu potencial antagonista

contra espécies micotoxigênicas são fundamentais para garantir a qualidade e segurança do produto.

Diante do exposto, os objetivos neste estudo foram:

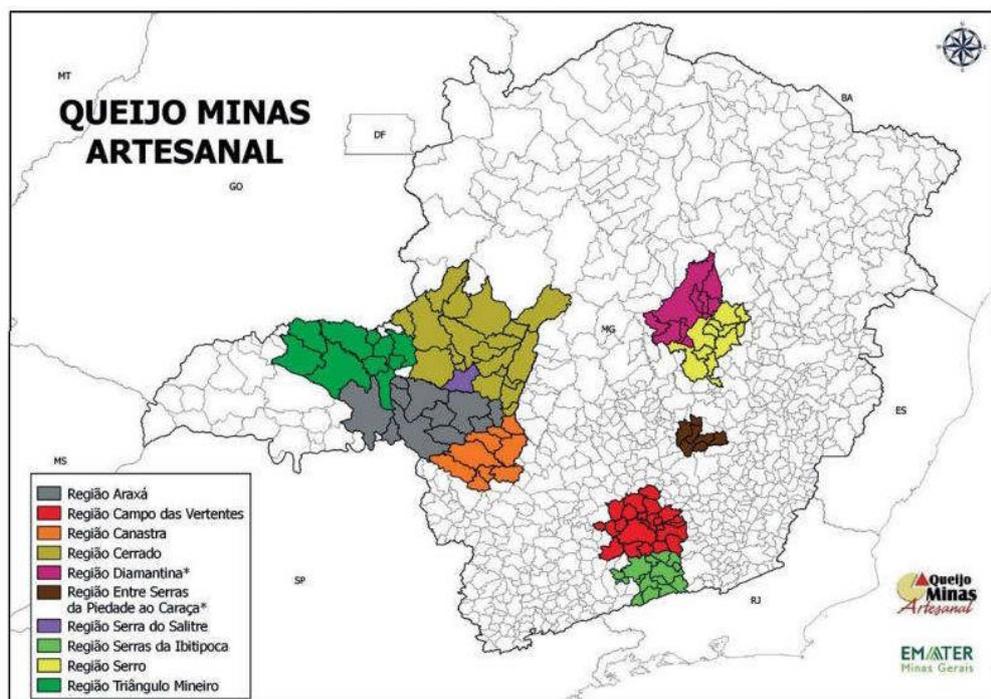
- a) Avaliar o efeito da temperatura e da atividade de água ( $a_w$ ) no crescimento e risco potencial de produção de OTA (ORI) por *A. ochraceus*, em meio de cultura à base de queijo;
- b) Avaliar a eficiência de *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida zeylanoides* e *Candida catenulata* no controle da taxa de crescimento de *A. ochraceus* em meio de cultura à base de queijo e determinar o potencial risco de produção de OTA (ORI);
- c) Determinar os mecanismos de ação antagonistas dos fungos autóctones, seja por competição por nutrientes e espaço, produção de metabólitos solúveis ou por compostos orgânicos voláteis antifúngicos (COVs);
- d) Identificar os compostos orgânicos voláteis (COVs) com atividade antifúngica produzidos por *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* e *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida zeylanoides* e *Candida catenulata*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Regiões produtoras de Queijo Minas Artesanal

Embora haja produção de queijos artesanais em todo território do Estado de Minas Gerais, a variedade Queijo Minas Artesanal (QMA) é produzida atualmente em dez regiões reconhecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER) e cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). A Figura 1 mostra a localização das regiões reconhecidas como produtoras de QMA: Araxá, Campos das Vertentes, Cerrado, Serra da Canastra, Serra do Salitre, Serro, Triângulo Mineiro, Serras da Ibitipoca, Diamantina e Entre Serras de Piedade ao Caraça (EMATER, 2023).

Figura 1 - Mapa do Estado de Minas Gerais representando as dez regiões produtoras de Queijo Minas Artesanal.



Fonte: EMATER (2023).

Nessas regiões, a produção do QMA se trata de um fator cultural de grande importância socioeconômica para a agricultura familiar. Segundo um levantamento realizado pela EMATER no ano de 2022, são 3,103 agroindústrias familiares específicas para a produção do Queijo Minas Artesanal. Estima-se uma produção de 21,8 mil toneladas por ano, o que representa 65,2% da produção dos queijos artesanais das agroindústrias familiares (EMATER, 2023).

Os fatores climáticos, assim como, o tipo de solo, altitude, pastagem e a própria água utilizada, são algumas das razões pelas quais as características dos queijos produzidos em cada região são tão particulares (SILVA et al., 2013). A qualidade e o sabor levaram o produto a ser reconhecido pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), em dezembro de 2011. E assim, estas regiões passaram a ser reconhecidas com certificação de Indicação Geográfica (IG), conquistando o título de produtor exclusivo desse tipo de queijo (MEDEIROS, 2015). A IG é uma ferramenta importante de proteção da origem. Seu registro destaca o produto como o QMA no mercado, agregando valor às regiões e diferenciando-o no mercado consumidor. Além de controlar a produção, garantindo a rastreabilidade, em decorrência de suas características geográficas, socioculturais e históricas (INPI, 2011).

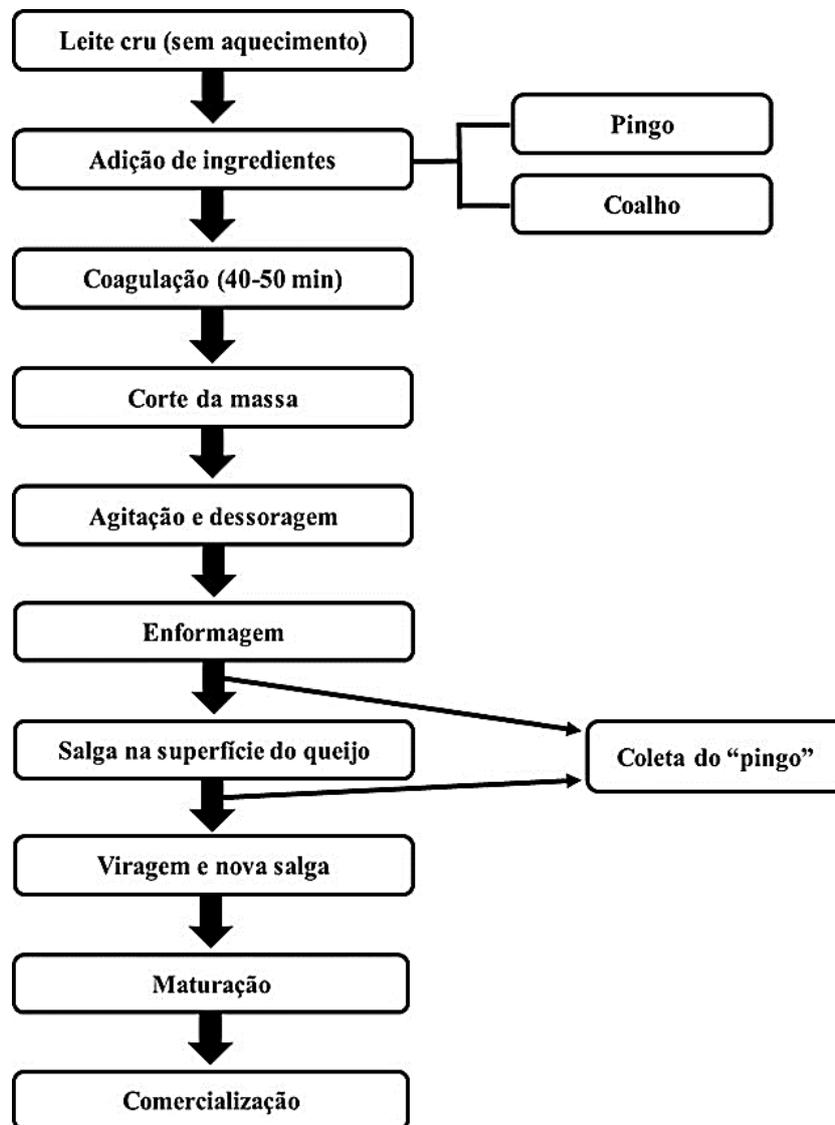
De acordo com Harbutt (2010), essa certificação reconhece a particularidade de cada alimento feito tradicionalmente, sendo, portanto, o resultado de uma complexa interação entre, solo, planta e clima, que quando combinados com métodos de produção e matérias primas, não pode ser reproduzida em nenhum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

Portanto, a certificação de origem de um queijo identifica seu *terroir*, que é uma palavra francesa que não tem tradução e está relacionada ao ambiente particular de uma região, expressando a qualidade, tipicidade e identidade de um produto (TONIETTO, 2007; HARBUTT, 2010).

## **2.2 Processo de produção e maturação do Queijo Minas Artesanal**

É considerado QMA somente aquele queijo que mantém as características de produção tradicional, a partir de mão de obra familiar, com mínima mecanização e produção em baixa escala, utilizando-se o leite cru e culturas de soro natural como iniciantes (KUPIEC, 1998). Este inóculo endógeno, rico em microrganismos autóctones, denominado “pingo”, consiste no soro fermento coletado após a prensagem do queijo do dia anterior. O pingo é adicionado ao leite cru junto com o coalho e sal, como pode ser visto no fluxograma de produção (Figura 2). De forma semelhante o QMACF segue o mesmo processo de fabricação, exceto pela raspagem da casca, permitindo o desenvolvimento de fungos filamentosos. A Resolução Nº 42 de 27 de dezembro de 2022, reconhece o Queijo Minas Artesanal na variedade de Casca Florida e permite a comercialização do queijo inicialmente pela presença de *G. candidum* como espécie dominante (MINAS GERAIS, 2022).

Figura 2 - Fluxograma de produção de Queijo Minas Artesanal.



Fonte: Adaptado de Machado (2004).

A maturação é a etapa final da fabricação dos QMAs, sendo crucial para o estabelecimento das características sensoriais típicas do produto. Nesse processo, ocorre uma complexa interação entre fatores de ordem biológica e bioquímica que agem modificando as propriedades físico-químicas da massa do queijo, influenciando a textura, consistência e formando compostos que serão responsáveis pelo desenvolvimento dos sabores e aromas característicos de cada variedade (FOX, 1998). Os compostos voláteis aromáticos incluem álcoois, ácidos, ésteres, aldeídos e cetonas; e as substâncias de sabor não voláteis são principalmente ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares redutores, nucleotídeos e polipeptídeos

(ZHENG et al., 2021). Como se sabe, não só o processo de fabricação em si, mas o período de maturação promove diferenças sensoriais significativas, além de criar um ambiente inóspito para microrganismos patogênicos (BONY et al., 2015; DINIZ, 2013). Durante a maturação, ácidos orgânicos gerados pela fermentação microbiana da lactose, assim como a redução do pH, devido a produção de ácidos, contribuem para a redução e/ou eliminação de possíveis patógenos contaminantes, tornando o queijo artesanal mais seguro para o consumo (NERO et al., 2008; BRANT, 2007).

Até o momento o IMA definiu um período mínimo de 17 dias de maturação em temperatura ambiente para a microrregião do Serro, mínimo de 14 dias para as microrregiões de Araxá, Canastra e Serra do Salitre e mínimo de 22 dias para as regiões de Diamantina, Entre Serras da Piedade ao Caraça, Campo das Vertentes, Cerrado, Serras da Ibitipoca, e Triângulo Mineiro, para garantir a segurança do produto de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela Lei 14.185 de Janeiro de 2002 (MINAS GERAIS, 2002; IMA, 2021). No entanto, apesar da maturação contribuir para a eliminação de microrganismos patogênicos, essa etapa não deve ser utilizada para resolver falhas sanitárias ocorridas durante a obtenção do leite cru e produção dos queijos. O objetivo principal da maturação é proporcionar o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis ao produto final (FIGUEIREDO et al., 2015).

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

### 2.3 Fungos micotoxigênicos encontrados em queijos e os fatores que influenciam na produção das micotoxinas

O queijo é considerado um excelente substrato para o desenvolvimento de fungos filamentosos. Alguns gêneros importantes que se desenvolvem, incluem *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Trichoderma*. As espécies micotoxigênicas de maior incidência em queijos duros, semi-duros e semi-moles de diferentes países pertencem ao gênero *Penicillium* seguido por *Aspergillus* (NIELSEN, 1998; SENGUN, 2008; KURE, 2019).

O *Penicillium commune* está entre as espécies micotoxigênicas mais importantes relacionadas a defeitos em queijo duros, semi-duros, e queijos semi-macios de vários países, além de ser produtor de ácido ciclopiazônico. As espécies micotoxigênicas de menor ocorrência em queijos incluem *P. crustosum*, *P. palitans*, *P. solitum*, *P. discolor*, *P. verrucosum* e *Aspergillus versicolor* (KURE, 2019; BANJARA, 2015, DOBSON, 2017).

As micotoxinas são metabolitos secundários com diferente estabilidade em alimentos. As toxinas com maior estabilidade relatadas sob condições normais de processamento do queijo são: ocratoxina A, citrinina, ácido ciclopiazônico, penitrem A, roquefortine C, esterigmatocistina e aflatoxinas. Outras, incluindo patulina, ácido penicílico e toxina PR não são estáveis em queijo (SENGUN, 2008; OSTRY, 2017; KURE, 2019).

Estes metabólitos são considerados de grande risco para a saúde humana ou animal, devido a sua toxicidade, em particular a sua carcinogenicidade. Para evitar esses riscos, a Agência Internacional Pesquisa sobre Câncer (IARC) em Lyon (França) - através do Programa de monografias da IARC - realizou uma avaliação de risco de micotoxinas em humanos, com base em experimentos em animais sobre câncer e dados epidemiológicos. De acordo com o risco, os agentes foram classificados pela IARC em cinco grupos (grupo 1, 2A, 2B, 3 e 4). O grupo 1 é carcinogênico para humanos; grupo 2A (provavelmente carcinogênico para humanos); grupo 2B (possivelmente carcinogênico para humanos); grupo 3 (não classificável quanto à sua carcinogenicidade para seres humanos) e grupo 4 (provavelmente não é cancerígeno para humanos) (IARC, 2015; IARC, 2016; OSTRY, 2017).

As micotoxinas foram então classificadas seguindo estes grupos de riscos, na qual resumidamente as aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1 pertencem ao grupo 1, de maior risco; a ocratoxina A (grupo 2B), citrinina (grupo 3), fumonisina B1 e B2 (grupo 2B), esterigmatocistina (grupo 2B), patulina (grupo 3), entre outras (IARC, 2015; IARC, 2016; OSTRY, 2017).

As micotoxinas são produzidas por diferentes gêneros de fungos filamentosos, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, que podem ocorrer em alimentos como resultado do crescimento de certas espécies. A presença destes metabólitos em produtos lácteos pode ter duas origens: contaminação indireta, que resulta de animais em lactação que ingeriram alimentos contaminados, e por contaminação direta, pelo crescimento intencional ou contaminação dos produtos durante a produção, maturação ou armazenamento (SENGUN, 2008; UMESHA et al., 2017).

O crescimento intencional de cepas autóctones do *terroir* durante a fabricação de queijos de leite cru, como forma de manter a sua autenticidade ou satisfazer os requisitos para manter o status de Denominação de Origem Protegida (DOP), contribui para a tipicidade do queijo. No entanto, estes produtos são mais propensos a conter quantidades consideráveis de micotoxinas, devido à diversidade de espécies fúngicas envolvidas no processo de produção e maturação. Além do mais, algumas destas cepas podem ser altamente toxigênicas, se as condições abióticas extrínsecas e intrínsecas ao queijo permitirem (BENKERROUM, 2016; HYMERY et al., 2014; HARBUTT, 2010).

Entre as diferentes micotoxinas frequentes em queijos, a esterigmatocistina é produzida por diferentes espécies de *Aspergillus*, sendo o principal produtor o *A. versicolor*. A citrinina é produzida por uma grande variedade de espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*. Contudo, apenas *P. verrucosum*, *P. citrinum* e *P. expansum* são conhecidos por produzir citrinina no queijo. Já a ocratoxina A (OTA) é relatada em queijos associada a espécies incluindo *Aspergillus ochraceus*, *P. verrucosum* e *P. nordicum*, sendo o primeiro o produtor mais comum de OTA nas regiões tropicais do mundo (DOBSON, 2017).

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

Recentemente, Aragão et al. (2022) e De Souza et al. (2021), determinaram a microbiota do QMA, e identificaram espécies importantes para as características organolépticas do produto, bem como espécies micotoxigênicas, na qual se destacou o gênero *Aspergillus*. O crescimento de espécies como *A. flavus* e *A. ochraceus*, pode afetar a qualidade dos produtos. No entanto, o crescimento indesejado de tais espécies não implica automaticamente que as micotoxinas estejam presentes (UMESHA et al., 2017). Nesse sentido, estudos em diferentes alimentos vêm sendo realizados para entender quais são os fatores nutricionais e ambientais

que regulam a produção de micotoxinas (KELLER et al., 1997; CERVINI et al., 2020; CASQUETE et al., 2019).

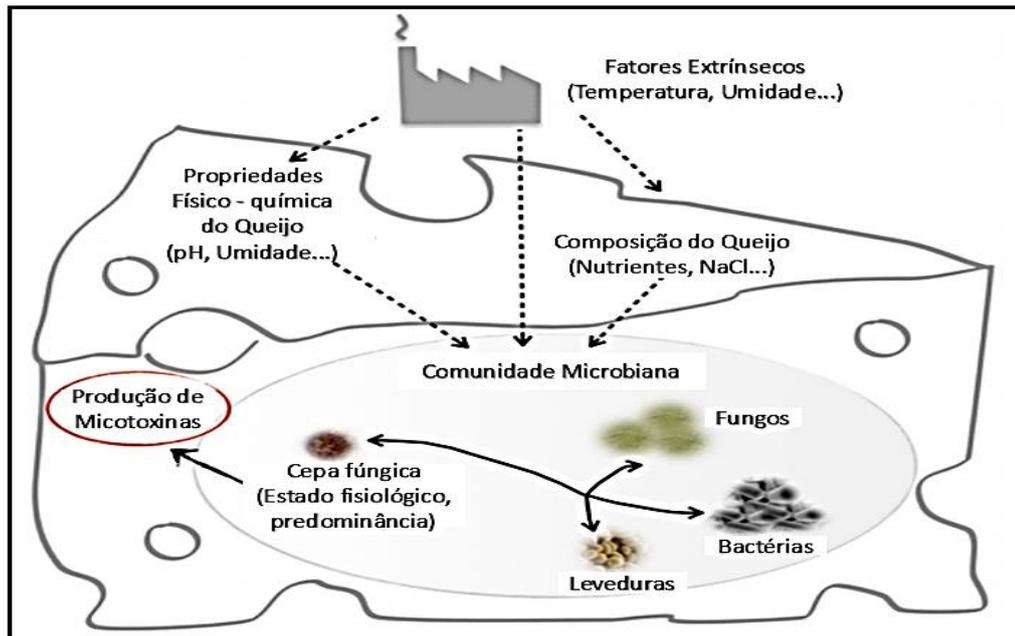
As aflatoxinas são um grupo de toxinas que ocorrem naturalmente produzidos por três espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus*. As quatro principais aflatoxinas produzidas naturalmente são: B1, B2, G1 e G2; com B1 sendo geralmente a aflatoxina encontrado em maior concentração em alimentos (SENGUN, 2008).

Em queijos, a principal toxina encontrada é a Aflatoxina M1, resultante de uma contaminação indireta do leite pela Aflatoxina B1. Sabe-se que B1 contamina a alimentação que é mais consumida pelas fêmeas lactantes. Em consequência a aflatoxina B1 é metabolizada em M1 no fígado do animal e depois excretado no leite (FONTAINE, 2015).

Devido ao potencial risco para a saúde, muitos países estabeleceram limites máximos toleráveis de micotoxinas. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 18 de fevereiro de 2011, por meio da RDC nº 7 determinou os limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos. Para os queijos só existe limite estabelecido para aflatoxina M1, que permite 2,5 µg/kg. No entanto, os limites da aflatoxina M1 em queijos são altamente variáveis nos países (BRASIL, 2011).

A produção de metabólitos secundários, não é essencial para o desenvolvimento da cepa produtora, portanto as micotoxinas são normalmente produzidas após o fungo filamentosos atingir a fase estacionária de crescimento. No entanto, a produção de micotoxinas e sua estabilidade no queijo podem mudar sob diferentes fatores bióticos e abióticos (Figura 3). Os principais fatores abióticos podem ser divididos em fatores ambientais e de produção, podendo ser intrínseco, como a composição físico-química do queijo (pH, atividade de água ( $a_w$ ) e teor de NaCl, ou ainda a sua própria composição (fontes de carbono e nitrogênio). E os fatores extrínsecos, incluem temperatura, umidade relativa, atmosfera de armazenamento, tempo de maturação, e ainda fatores bióticos como as interações microbianas (HYMERY et al., 2014; BENKERROUM, 2016).

Figura 3- Principais fatores bióticos e abióticos na produção de micotoxinas.



Fonte: Adaptado de Hymery et al. (2014).

A taxa de ativação e regulação de genes relacionados a biossíntese de micotoxinas é regulada pela influência de fatores bióticos e abióticos (HYMERY et al., 2014; ABBAS, 2009; STOLL, 2013). De fato, em estudos recentes empregando PCR quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR), Cervini et al. (2020) demonstrou como a expressão gênica de *Aspergillus carbonarius* cultivado em meio à base de uva, foi modulada por fatores ecofisiológicos, como temperatura e  $a_w$ , e Casquete, et al. (2019) determinou como o pH,  $a_w$  e temperatura influenciaram o nível de expressão de genes reguladores (afl R e afl S) e estrutural (afl P), relacionados a produção de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>) por *Aspergillus flavus* em meio sintético de queijo.

#### 2.4 Ocratoxina A: caracterização, regulação, ocorrência e limites máximos de ingestão

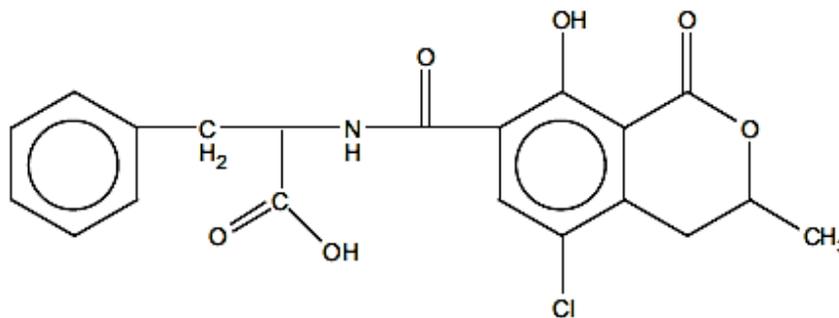
A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzida principalmente por espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, frequentemente encontrado em diversos produtos alimentares, tais como cereais, feijões, especiarias, frutos secos, nozes e sementes oleaginosas. Foi pela primeira vez isolada por Van der Merwe em 1965 a partir de *A. ochraceus*. Esta espécie é considerada a mais comum na produção de OTA em regiões tropicais, e *P. verrucosum*, também produtor de OTA, frequentemente associada a cereais, azeitona e também queijos, predomina em regiões mais temperadas como leste e nordeste da Europa (ABBAS, 2009; DOBSON, 2017). A OTA também é produzida por outras espécies de *Penicillium* como *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. glycyrrhizicola*, *P. polonicum*, e *P. nordicum*. Sendo a última

geralmente associada a alimentos ricos em NaCl e proteínas, tais como queijos e carnes fermentadas (DOBSON, 2017; VAN DER MERWE, 1965; WANG et al., 2016).

Normalmente, espécies de *Aspergillus* predominam em regiões quentes e temperadas, enquanto *Penicillium* são frequentes em zonas mais frias. Entre as espécies produtoras de OTA do gênero *Aspergillus*, a maioria pertence às duas Seções: *Circumdati* (*A. ochraceus*) e *Nigri* (*A. carbonarius* e *A. niger*) (WANG et al., 2016). Em queijos, a espécie mais frequentemente isolada pertence à Seção *Circundati*, representada por *A. ochraceus*. É considerado um grande produtor de OTA não só em queijos, mas em diferentes alimentos nas regiões tropicais do mundo (DOBSON, 2017).

Ao analisar a estrutura de OTA (Figura 4), é possível observar que se trata de um metabólito secundário derivado de policetídeo e contém uma porção dihidrocoumarina ligado a um grupo L- β- fenilalanina (Phe), derivado da via do ácido chiquímico, por uma ligação amida (CALLAGHAN, 2016; WANG et al., 2016).

Figura 4- Estrutura química da ocratoxina A.



Fonte: Callaghan (2016).

De acordo com a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), a OTA é uma micotoxina principalmente nefrotóxica, embora apresente outros efeitos como a hepatotoxicidade, teratogenicidade e imunossupressão. Assim, a IARC classificou de acordo com o risco, como um metabólito carcinogênico para o humano de grupo 2B (IARC, 2016; OSTRY, 2017).

É considerada uma das mais importantes micotoxinas em produtos alimentares, pela sua alta toxicidade e pelo fato de ser produzida por uma diversidade de fungos filamentosos que se desenvolvem em uma ampla variedade de alimentos. Por isso, é um problema não só na segurança alimentar, mas também representa um impacto econômico pela contaminação de produtos (WANG et al., 2016).

Estudos anteriores demonstraram que a biossíntese de micotoxinas é um fator adaptativo para o substrato/ alimento que estão se desenvolvendo. Assim, fatores extrínsecos ativam

determinadas vias de sinalização que modulam a biossíntese das micotoxinas (GEISEN et al., 2018). Schimidt-Heydt et al. (2012) demonstrou que espécies do gênero *Penicillium* potencialmente produtoras de OTA, tais como *P. nordicum* comumente encontrado em queijos e *P. verrucosum* (produtor também de citrinina), são adaptados a alimentos com alta concentração de NaCl. Nestas espécies, o alto nível externo de NaCl induz a expressão do Gene OTA pKs PN (policetídeo sintase de OTA) pela via HOG MAP quinase. Estes resultados sugerem, que a biossíntese e excreção constante de ocratoxina A, que contém em si um átomo de cloreto, garante uma homeostase cloreto na célula fúngica.

Vale ressaltar que espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. ochraceus*, produtores de OTA, não são adaptados para ambientes com altas concentrações de NaCl. Não há ativação da via HOG MAP quinase na presença de altas concentrações NaCl, demonstrando que a biossíntese de uma mesma micotoxina, pode ser regulada por diferentes fatores externos estimulando as mesmas vias, entre espécies diferentes (SCHMIDT-HEYDT et al., 2012; STOLL, 2013; WANG et al., 2016).

De acordo com Stoll (2013) a produção de OTA por estas espécies pode ser ativada em resposta ao estresse osmótico que ativa a via de HOG MAP quinase. Já o estresse oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênios (ROS) é capaz de ativar a via da cAMP / pka, e uma ampla faixa de pH é capaz de modular a via de pac C para a produção de OTA (WANG et al., 2016).

Devido ao potencial risco para a saúde, muitos países estabeleceram limites máximos toleráveis de micotoxinas em alimentos de acordo com o Codex Alimentarius ou legislações específicas, como a União Européia e o Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos (MAZIERO et al., 2010). Em relação aos níveis de OTA, existem limites estipulados para diversos cereais, no entanto, poucos países têm legislação para queijos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 18 de fevereiro de 2011, por meio da RDC nº 7 determinou os limites máximos tolerados de 2 a 30 µg/kg para diversos alimentos, tais como: cereais, café, frutas secas, vinho, suco de uva, entre outros, mas não existe especificações para os queijos (BRASIL, 2011).

## **2.5 Técnicas para determinação de compostos orgânicos voláteis e micotoxinas**

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzido por fungos tem diferentes funcionalidades nos alimentos, como inibição de fungos contaminantes pela ação antifúngica (HUANG et al., 2021) e ainda atuam na qualidade sensorial do produto (JOLLIVET et al.,

1994; MOLIMARD, 1996). Nogueira (2005) relata a importância de COVs no estabelecimento de sabor e aroma em queijos. A determinação qualitativa desses compostos emprega usualmente a cromatografia gasosa com detector de massa acoplado (GC-MS). Essa técnica possui detecção altamente sensível, permitindo analisar centenas de compostos simultaneamente, incluindo ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, álcoois, aminas aromáticas, ácidos graxos, dentre outros, na qual em alguns casos a derivatização é necessária. Uma grande vantagem para a aplicação em estudos metabólicos, é a disponibilidade de bibliotecas espectrais, conferindo alta credibilidade na identificação dos compostos, que combina a informação de tempo de retenção e o padrão de fragmentação obtido, em decorrência da ionização por elétrons (BELINATO, 2019; MAUD et al., 2006).

A técnica analítica depende da qualidade do preparo da amostra, e sobretudo a extração é uma etapa de extrema importância nos estudos metabólicos. Em análises não direcionadas o objetivo é extrair o maior número de compostos de muitas classes químicas de forma qualitativa. Ao se tratar de metabólitos voláteis, a principal técnica utilizada é a microextração em fase sólida (SPME) (BELINATO, 2019).

Jollivet et al. (1994) identificou 34 compostos aromáticos voláteis produzidos por *G. candidum* em meio sintético de queijo, incluindo álcoois, metil cetonas, ácidos graxos e ésteres, empregando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Dentre os compostos aromáticos, os que mais se destacaram entre as cepas foram álcoois primários como propanol, 2-metilpropanol (aroma de álcool) e 3-metilbutanol (aroma de álcool e frutado) por catabolismo de aminoácidos. Uma cepa de *G. candidum* também produziu fenol e feniletanol (aroma de rosas e florais), considerados componentes importantes para favorecer o aroma de queijos macios e queijos maturados (JOLLIVET et al., 1994; MOLIMARD, 1996).

Os COVs produzidos por fungos antagonistas com potencial antifúngico vem sendo estudado empregando a análise de SPME-GC-MS. Contarino et al. (2019) determinaram o perfil metabólico de compostos orgânicos voláteis (COVs) com propriedades antifúngicas produzidos pelas leveduras *Wickerhamomyces anomalus*, *Metshnikiwia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans* e *Saccharomyces cerevisiae*, empregando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) acoplada à cromatografia gasosa com detector de massa (GC-MS). Os álcoois (álcool etílico, 3-metil-1-butanol e álcool fenetílico) e os ésteres (acetato de etila e acetato de isoamila) foram os principais COVs com propriedades antifúngicas produzidos pelas leveduras.

O biocontrole vem ganhando destaque em diferentes setores, inclusive no alimentício, por ser um método alternativo para controlar o crescimento de fungos micotoxigênicos e a produção de micotoxinas. De acordo com Farbo et al. (2018) a produção de OTA e o crescimento de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* foram reduzidos pela ação de COVs antifúngicos produzido por *Cyberlindnera jadinii*, *Candida fritorichii*, *Candida intermedia* e *Lachancea thermotolerans*. Os COVs foram detectados pela análise de HS-SPME-GC-MS e o principal composto detectado foi o 2-feniletanol. A produção de COVs por leveduras representam uma ferramenta promissora para inibir o crescimento de fungos micotoxigênicos e, portanto, possuem um papel importante para a qualidade e segurança dos alimentos.

A contaminação por fungos micotoxigênicos é um grande problema no processamento de alimentos. Devido à toxicidade das micotoxinas e as perdas econômicas resultante do descarte dos alimentos, o uso de métodos precisos na detecção e quantificação de diferentes micotoxinas ganhou destaque (HYMERY et al., 2014). Dentre os métodos analíticos clássicos para detecção e / ou quantificação, as técnicas cromatográficas são rotineiramente usadas para quantificar micotoxinas em alimentos. Particularmente para análises em queijo, pode ser empregada a cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC) e espectrometria de massa (MS) acoplada com cromatografia (HYMERY et al., 2014; DOBSON, 2017).

Atualmente, as análises quantitativas de AFM1 em queijos, tem empregado principalmente a cromatografia líquida (LC-MS) e a cromatografia gasosa (GC-MS). No entanto, as análises de GC são menos recomendadas, devido a necessidade de derivatização das amostras (HYMERY et al., 2014; KETNEY, 2017). Essa técnica baseia-se na partição de compostos entre duas fases diferentes, uma fase estacionária líquida e uma fase móvel gasosa. Para a detecção das micotoxinas podem ser utilizados detectores de ionização de chama (FID) ou detectores por captura de elétrons (ECD) com um espectrômetro de massa (MS). Após a adsorção da amostra é também empregado a espectroscopia visível (UV – VIS), antes da derivatização necessária para a análise quantitativas das micotoxinas (MAHFUZ et al., 2018).

A cromatografia líquida (LC) emprega uma fase estacionária sólida, na qual as amostras são separadas com base nas interações com as fases móveis e estacionárias. Assim, os compostos são separados por suas diferenças em tamanho, particionamento, adsorção ou troca iônica. Em HPLC, é empregado uma fase móvel líquida para eluir a amostra imobilizada em uma fase estacionária líquida em uma coluna. A separação dos compostos ocorre pelo

particionamento do analito entre as duas fases, devido à diferença nos coeficientes de particionamento. Existem dois tipos de análise com o HPLC, sendo uma de fase normal, contendo uma fase estacionária polar (sílica gel) e um solvente não-polar (hexano). Enquanto que, a cromatografia em fase reversa (também conhecida como RPHPLC), muito utilizada para análises de micotoxinas, emprega uma fase estacionária de hidrocarbonetos (não-polares) C-8 ou C-18, e uma fase móvel polar podendo ser metanol, água ou acetonitrila. São utilizados diferentes tipos de detectores, sendo os principais o detector de UV, detector de arranjo de diodos (DAD) e detector de fluorescência (FLP) (COSKUN, 2016; MOLDOVEANU, 2016; MAHFUZ et al., 2018).

Nos últimos anos, a maioria desses métodos tem sido utilizada em conjunto com técnicas de imunoafinidade para simplificar a extração e melhorar a recuperação e medição de micotoxinas em alimentos. Estes métodos imunoquímicos são específicos para cada tipo de micotoxina ou para um pequeno grupo de compostos com estruturas semelhantes, e assim, as técnicas cromatográficas podem discriminar entre uma diversidade de substâncias (HYMERY et al., 2014; KETNEY, 2017).

Embora essas técnicas cromatográficas ofereçam sensibilidade excepcional para as análises, é necessário um pré-tratamento nas amostras, além empregar equipamentos caros e necessitar de operadores qualificados (MAHFUZ et al., 2018).

Antes do advento da HPLC, a cromatografia em camada delgada era a técnica mais adequada. Embora, ainda seja considerada como uma técnica rápida e barata para análise de micotoxinas, não é quantitativa. É usado para a separação e identificação das micotoxinas através de uma fase estacionária imobilizada em uma placa de vidro ou plástico, e uma fase móvel que geralmente é uma mistura de solvente, para promover a separação. Após a eluição da amostra pela placa cromatográfica, é feita a visualização das micotoxinas por luz UV (MAHFUZ et al., 2018).

A confirmação da presença de micotoxinas nas amostras também pode ser realizada empregando abordagens mais simples de métodos qualitativos ou semiquantitativos, como o teste de ELISA. Existem muitos kits de bioensaios disponíveis no mercado para análise de micotoxinas, mas nenhum kit é específico para amostras de queijo. Devido à alta complexidade da matriz de queijo, atualmente as técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massa (MS), particularmente a LC / MS / MS, apresentam maior sensibilidade para detectar e quantificar micotoxinas no queijo (KETNEY, 2017; HYMERY et al., 2014).

## 2.6 Prevenção e controle de fungos micotoxigênicos em alimentos

O conhecimento das condições que estimulam ou inibem o crescimento de espécies micotoxigênicas e a produção de micotoxinas é importante em termos de saúde pública e qualidade alimentar. Este entendimento é necessário para aplicar medidas de controle através da manipulação de fatores como a atividade de água, temperatura, composição de gás na embalagem, aplicação de conservantes químicos ou proteção com o biocontrole (SENGUN, 2008; CASQUETE et al., 2018).

As estratégias para reduzir a contaminação devem ser aplicadas levando em consideração as características do produto, de forma a preservar as propriedades nutricionais e sensoriais (ALIZADEH et al., 2021). Em geral, espécies contaminantes fúngicas são menos adaptadas para substratos com altas concentrações de cloreto de sódio, pela redução da atividade de água disponível necessária para o desenvolvimento fúngico. No entanto a baixa atividade de água resultante e o aumento do nível de cloreto de sódio podem desencadear um efeito negativo sobre as propriedades organolépticas dos produtos (HYMERY et al., 2014; DOBSON, 2017; THANABORIPAT et al., 1992).

As espécies micotoxigênicas são aeróbios obrigatórios, sendo assim, uma das estratégias para limitar o crescimento destes fungos, assim como a produção de micotoxinas, é proporcionar ambientes com baixas concentrações de oxigênio (O<sub>2</sub>) e / ou altas concentrações de outros gases como o gás carbônico (CO<sub>2</sub>). Consequentemente, a embalagem a vácuo é considerada uma ótima alternativa de proteção (HYMERY et al., 2014).

Outras formas de armazenamento também proporcionam uma maior segurança prevenindo principalmente a ocorrência de micotoxinas. O armazenamento refrigerado de 5 a 7 °C é uma medida importante na prevenção de micotoxinas pela redução do desenvolvimento de contaminantes. Além disso, o queijo é considerado um substrato complexo para a produção de micotoxinas. No entanto, espécies de *Penicillium* são adaptadas para baixas temperaturas e, portanto, tem maior capacidade de se desenvolver nestas temperaturas (SENGUN, 2008; HYMERY et al., 2014).

Conservantes químicos como ácido sórbico, benzóico e propiônico são usados para impedir o crescimento de fungos contaminantes, exceto *P. roqueforti*. Esta espécie é resistente a esses conservantes e, consequentemente, é a espécie mais importante de deterioração em queijos, exceto para o tipo Gorgonzola ou Roqueforti (DOBSON, 2017; HYMERY et al., 2014). Outros conservantes como a piramicina (natamicina), é comumente usada como um

agente antifúngico em alguns países europeus e tem sido empregado em certos queijos nos Estados Unidos (HYMERY et al., 2014; SENGUN, 2008).

Como relatado, existem vários tratamentos físicos e químicos para o combate de fungos indesejáveis nos alimentos. Entretanto, estes métodos não são seletivos contra apenas espécies toxigênicas, e acabam inibindo também espécies fúngicas benéficas. Sendo assim, o biocontrole vem ganhando destaque para manter a segurança de produtos tradicionais maturados, como queijos e produtos cárneos. A microbiota autóctone concorrente fornece uma ferramenta adicional para restringir o desenvolvimento de fungos contaminantes e a produção de micotoxinas nos alimentos (DELGADO et al., 2016; SENGUN, 2008). De acordo com Delgado et al. (2016), as leveduras podem atuar como agentes antagonistas contrar o crescimento de fungos contaminantes em laticínios e produtos cárneos por diferentes mecanismos, como a competição por espaço e nutrientes, produção de toxinas assassinas (proteínas Killer), atividade de enzimas hidrolíticas extracelulares e inibição por compostos voláteis antifúngicos.

A redução das micotoxinas pode ser relacionada por diferentes vias, como à adsorção à parede celular, redução da expressão de genes específicos relacionados a biossíntese da micotoxina, ou ainda ocorrer a degradação desse metabólito secundário (DAS NEVES et al., 2021; FARBO et al., 2018; GIL-SERNA et al., 2011; ZHANG et al., 2018; FIORI et al., 2014).

Diferentes estudos destacaram o potencial antagônico de *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida catenulata* e *Candida zeylanoides*, contra o crescimento de fungos contaminantes e/ ou micotoxigênicos. Testes *in vitro* indicam que a interação pode ainda afetar a produção de micotoxinas. De fato, Ghanbari et al. (2019) relatou que *K. lactis* possui uma potente atividade inibitória sobre a taxa de crescimento de *Aspergillus parasiticus* concomitantemente com a redução da produção de aflatoxina B1 (AFB<sub>1</sub>). O autor relacionou a redução do acúmulo de AFB<sub>1</sub> à diminuição da expressão gênica (gene aflR) da via da aflatoxina. Já Medina-Córdova et al. (2016) relataram o efeito antagonista de *D. hansenii* contra o desenvolvimento de fungos micotoxigênicos em grãos de milho e na redução da produção de fumonisinas por *Fusarium subglutinans* em 59,8%. O efeito sinérgico foi associado a fatores como a competição por nutrientes e espaço, bem como a produção de compostos solúveis e voláteis extracelulares. Em relação à produção de OTA, Virgili et al. (2012) mostraram a eficácia na redução da produção dessa micotoxina por *Penicillium nordicum*, com maior eficiência nos ensaios empregando *C. zeylanoides* e *Hyphopichia burtoni*. Além da inibição de crescimento, Pantelides et al. (2015) observaram a capacidade de *C. zeylanoides* em reduzir a esporulação de *Aspergillus tubingensis*.

Em trabalhos anteriores, Nielsen (1998) e Decker (2005) demonstraram que algumas culturas iniciadoras frequentemente utilizadas em queijos, particularmente *Geotrichum candidum*, possuem um papel essencial no controle de espécies de *Penicillium* contaminantes em queijos. Os estudos foram realizados apenas com espécies do gênero *Penicillium*, por serem as espécies de maior ocorrência em queijos de diferentes países. No entanto, no Queijo Minas Artesanal produzido no Brasil, De Souza et al. (2021) e Aragão et al. (2022) relataram a presença de espécies micotoxigênicas pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

De acordo com Nielsen (1998b), as interações fúngicas observadas entre culturas iniciadoras como *G. candidum* e espécies contaminantes em queijos, provavelmente correspondem com antagonismo indireto, seja por competição por nutrientes e espaço ou por antibiose. É possível que *G. candidum* também concorra por antibiose, como demonstrado por Tariq et al. (1991), na qual metabólitos voláteis das suspensões de artrósporos de *G. candidum* inibiu a germinação de conídios e reduziu a taxa de extensão hifal em diferentes intensidades em *Aspergillus flavus*, *Botrytis allii*, *Fusarium oxysporum*, *Microsporum canis* e *Penicillium italicum*.

A inibição de patógenos pela atividade de compostos orgânicos voláteis antifúngicos (COVs) foi relatado anteriormente por Mookherjee et al. (2018) em um estudo pioneiro, na qual demonstrou a eficiência antagônica de *G. candidum* contra *Rhizoctonia solani*. Os compostos 2-feniletanol, acetato de isopentil e naftaleno foram identificados como os principais contribuintes para sua atividade antifúngica.

O uso de leveduras autóctones contra fungos micotoxigênicos em produtos artesanais vem sendo explorado para manter as características do produto. Nesse sentido, Núñez et al., (2015) selecionou cepas de *D. hansenii* de produtos cárneos curados, com atividade antagônica contra espécies de *Penicillium* micotoxigênicas pela produção de compostos solúveis e voláteis (COVs) e ainda pelo mecanismo de competição por nutrientes e espaço, em condições que simulam a maturação de produtos cárneos.

De acordo com, Perez et al., (2017) as perdas por fitopatógenos fúngicos em citrus é um problema, principalmente para limões exportados que não podem sofrer aplicação de fungicidas, devido as exigências do mercado. O autor avalia a eficiência do controle biológico contra *Penicillium digitatum* em limões por leveduras killer, como *C. catenulata*, *P. fermentans*, *W. anomalus*, *K. exígua*, *C. paraugosa*, *S. cerevisiae* e *C. lusitaniar*. As leveduras *C. lusitaniar* e *P. fermentans* forneceram altos níveis de proteção, sugerindo que leveduras autóctones apresentam vantagens adaptativas em relação às leveduras isoladas de outras fontes.

Em outro estudo de biocontrole contra o patógeno causador do bolor verde em citrus, *Penicillium digitatum*, Delali et al. (2021) indica que as espécies antagonistas *Y. lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia kudriavzevii* são uma boa alternativa para reduzir a contaminação. De acordo com Delali et al. (2021), o antagonismo é resultado do efeito sinérgico ou isolado de diferentes mecanismos, como a produção de COVs antifúngicos, competição por nutriente e espaço, e ainda produção de enzimas líticas extracelulares, que desempenham um papel importante na lise da parede celular do patógeno.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É evidente que durante a maturação de queijos artesanais ocorre interações complexas entre a microbiota autóctone, e essas interações são fundamentais no estabelecimento de características sensoriais relacionadas à tipicidade do produto, o que ocorre no Queijo Minas Artesanal de Casca Florida. Pelo fato da produção ser realizada pelo método tradicional, empregando leite de vaca cru, pingo e com maturação em um ambiente que permite a veiculação de esporos fúngicos, é possível a contaminação por espécies ocratoxigênicas, como já relatado por Aragão et al. (2022) em QMA produzido na Canastra.

Atualmente nosso grupo de pesquisa busca compreender quais condições influenciam no crescimento e na produção de OTA por *A. ochraceus* afim de prever estratégias para minimizar os potenciais riscos na maturação e no armazenamento. Embora, observamos um risco de produção de OTA (ORI) em condições similares ao início da maturação do queijo em testes *in vitro*, a ocorrência natural de fungos autóctones ao longo da maturação pode garantir a segurança, impedindo o desenvolvimento de contaminantes e a produção de micotoxinas.

Portanto, a importância dos estudos sobre a diversidade micológica não está apenas relacionada à qualidade sensorial, mas também identificar as espécies de fungos prevalentes para compreender o seu papel como bioprotetores naturais do *terroir*. Neste estudo, *D. hansenii*, *G. candidum*, *Y. lipolytica*, *K. lactis*, *C. zeylanoides* e *C. catenulata* exibiram notável efeito antagonista contra *A. ochraceus*. Tais informações são valiosas para assegurar a qualidade do produto e ainda reforçam a legislação atual que reconhece o Queijo Minas Artesanal na variedade de Casca Florida, permitindo a comercialização do queijo pela presença de *G. candidum* como espécie dominante.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abdelhamid; VALEZ, Heriberto; DOBSON, Alan DW. Analysis of the effect of nutritional factors on OTA and OTB biosynthesis and polyketide synthase gene expression in *Aspergillus ochraceus*. **International journal of food microbiology**, v. 135, n. 1, p. 22-27, 2009.
- ALIZADEH, Adel Mirza et al. New perspective approaches in controlling fungi and mycotoxins in food using emerging and green technologies. **Current opinion in food science**, v. 39, p. 7-15, 2021.
- ANELLI, Pamela et al. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. **Food Microbiology**, v. 78, p. 62-72, 2019.
- ARAGÃO, M. O. et al. Fungal community and physicochemical profiles of ripened cheeses from the Canastra of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 12, p. 4685-4694, 2022.
- BANJARA, N.; SUHR, M.J.; HALLEN-ADAMS, H.E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. **Current microbiology**, 70(6), 792-800. 2015.
- BANK, J.M. Cheese. In: EARLY, R. The Technology of Dairy Products. 2.ed. **London. Ralph EARLY**. Cap.3, p.81-122.1998.
- BEHMER, M.L.A. Tecnologia do Leite: Produção, Industrialização e análise. 15.Ed. **São Paulo: Ed. Nobel**, 1985.
- BELINATO, J. R. Metabolômica microbiana: Inovações e aplicações. **Quim. Nova**, Vol. 42, No. 5, 546-559, 2019.
- BEMFEITO, R.M. et al. Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**. Vol. 99 No. 10, 2016.
- BENKERROUM, Noredine. Mycotoxins in dairy products: A review. **International dairy journal**, v. 62, p. 63-75, 2016.
- BIAGIOTTI, Claudia et al. Occurrence and involvement of yeast biota in ripening of Italian Fossa cheese. **European Food Research and Technology**, v. 244, p. 1921-1931, 2018.
- BONY, E.; STRAUB, C.; et al. Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. **PLoS One**. 10, e0124360. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>. 2015.
- BORELLI, Beatriz 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, 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**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 1570–1574, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RDC nº 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em

alimentos. Brasília, 2011. Disponível

em:<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC\\_07\\_2011\\_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966)> janeiro de 20230.

CALLAGHAN, Y. C., O'CONNOR, T. P., & O'BRIEN, N. M. Nutritional Aspects of Cheese. **Fundamentals of Cheese Science**, 715–730, 2016.

CAMARDO LEGGIERI, Marco; PIETRI, Amedeo; BATTILANI, Paola. Modelling fungal growth, mycotoxin production and release in grana cheese. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 69, 2020.

CARDOSO, Valéria 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.

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

CASQUETE, Rocío et al. Gene expression of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system to control aflatoxin production. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 9, p. 7765-7772, 2019.

CASQUETE, Rocio et al. Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. **LWT**, v. 89, p. 179-185, 2018.

CASQUETE, Rocío et al. The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 9, p. 6987-6996, 2017.

CERVINI, Carla et al. Effects of temperature and water activity change on ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* in field-simulating conditions. **International journal of food microbiology**, v. 315, p. 108420, 2020.

CONTARINO, Rosaria et al. Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. **Food microbiology**, v. 82, p. 70-74, 2019.

COSKUN, Ozlem. **Separation techniques: chromatography**. Northern clinics of Istanbul, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.

DAS NEVES, Taís Teixeira et al. Simulation of coffee beans contamination by *Aspergillus* species under different environmental conditions and the biocontrol effect by *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT**, v. 148, p. 111610, 2021.

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

DECKER, Marianne; NIELSEN, Per Væggemose. The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated fungi of white mould cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 51-60, 2005.

DELALI, Kottoh Isaac et al. Evaluation of yeast isolates from kimchi with antagonistic activity against green mold in citrus and elucidating the action mechanisms of three yeast: *P. kudriavzevii*, *K. marxianus*, and *Y. lipolytica*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 176, p. 111495, 2021.

DELGADO, Josue 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.

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

DOBSON, Alan et al. Mycotoxins in cheese. In: **Cheese**. Academic Press, 2017. p. 595-601.

EM- Estado de Minas. (2017). Queijo mineiro é premiado na França. [https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2017/06/14/internas\\_economia,876364/queijo-mi-neiro-e-premiado-na-franca.shtml](https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2017/06/14/internas_economia,876364/queijo-mi-neiro-e-premiado-na-franca.shtml). (Accessed 2 July 2020).

EMATER MG - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Levantamento da EMATER-MG mostra que Minas Gerais tem 32 mil agroindústrias familiares - Queijos artesanais**. 2012. Disponível em: < <https://www.emater.mg.gov.br/> > Acesso em 10 de julho de 2023.

EMATER MG - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Catálogo do Queijo Minas Artesanal**. 2023. Disponível em: < <https://www.emater.mg.gov.br/download.do?id=87229> >. Acesso em 10 de julho de 2023.

FADDA, MARIA ELISABETTA et al. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. **International journal of food microbiology**, v. 95, n. 1, p. 51-59, 2004.

FARBO, Maria Grazia et al. Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 1-10, 2018.

FIEMG - Federação das Indústrias do Estado de Minas Gerais. (2019). Queijos mineiros são premiados em concurso na França. <https://www7.fiemg.com.br/noticias/detalhe/queijos-mineiros-sao-premiados-em-concurso-na-franca>. (Accessed 15 July 2020).

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

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

FIORI, Stefano et al. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. **International journal of food microbiology**, v. 189, p. 45-50, 2014.

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

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

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

G1- Globo. (2021) Queijo brasileiro fica em segundo lugar em quantidade de medalhas em concurso mundial da França.  
<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2021/09/14/queijo-brasileiro-fica-em-segundo-lugar-em-quantidade-de-medalhas-em-concurso-mundial-da-franca.ghtml>. (Accessed 10 July 2023).

GEISEN, Rolf et al. Aspects of the occurrence, genetics, and regulation of biosynthesis of the three food relevant *Penicillium* mycotoxins: Ochratoxin A, citrinin, and patulin. **Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects**, p. 413-433, 2018.

GHANBARI, Rooholla et al. Biocontrol effect of *Kluyveromyces lactis* on aflatoxin expression and production in *Aspergillus parasiticus*. **FEMS microbiology letters**, v. 366, n. 10, p. fnz114, 2019.

GIL-SERNA, Jéssica 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, n. 1, p. 113-118, 2011.

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

HUANG, Chuchu et al. *Debaryomyces hansenii* strains isolated from Danish cheese brines act as biocontrol agents to inhibit germination and growth of contaminating molds. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 662785, 2021.

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

IARC (2015) Preamble to the IARC Monographs (amended January 2006). Available online: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/>. Accessed 02 Jan 2020.

IARC (2016) Presentations related to the IARC Monographs. IARC Monographs, Evaluations. IARC, Lyon. Available online: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/Evaluations.pdf>. Accessed 02 Jan 2020.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 2051, de 07 de abril de 2021**. Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 07 de abril de 2021.

INPI (2011). Instituto Nacional da Propriedade Industrial. **Indicações Geográficas Brasileiras**. <https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/indicacoes-geograficas/explorador-de-indicacoes-geograficas> (2011), Accessed 12th Sep 2020.

JOLLIVET, Nathalie et al. Production of volatile compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum* Link. **Journal of Dairy Research**, v. 61, n. 2, p. 241-248, 1994.

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

- KELLER, Nancy P. et al. pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus spp.* **Phytopathology**, v. 87, n. 6, p. 643-648, 1997.
- KETNEY, Otto; SANTINI, Antonello; OANCEA, Simona. Recent aflatoxin survey data in milk and milk products: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 3, p. 320-331, 2017.
- 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, Cathrine Finne; SKAAR, Ida. The fungal problem in cheese industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 29, p. 14-19, 2019.
- LOPANDIC, K. et al. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food microbiology**, v. 23, n. 4, p. 341-350, 2006.
- MACHADO, E.C. et.al. Características Físico-Químicas e sensoriais do Queijo Minas Artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(4): 516-521. 2004.
- MAHFUZ, Mustafa et al. General and advanced methods for the detection and measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites: a review. **Toxin Reviews**, 2018.
- MARTINS, José M. et al. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 219-230, 2015.
- MAUD. M. et al. Microbial Metabolomics with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**. 2006.
- MAZIERO, T.M. et al. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.
- MEDEIROS, M.L. **Indicações geográficas, turismo e desenvolvimento territorial: uma análise sistêmica da indicação de procedência do queijo minas artesanal do Serro.** Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- MEDINA-CÓRDOVA, Noé et al. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). **Biological Control**, v. 97, p. 70-79, 2016.
- MEDINA-CÓRDOVA, Noé et al. The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. **Biological Control**, v. 121, p. 216-222, 2018.
- MERKE, Van Der, et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* with. **Nature**. 1965.
- MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: **Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002.** Disponível em <http://www.almg.gov.br/>. Acesso ado em janeiro de 2020.
- MINAS GERAIS. Secretaria de estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento – SEAPA. **Resolução N° 42, 27 de dezembro 2022.** Reconhece e define sobre Queijo Minas Artesanal de Casca Florida (QMACF). Belo Horizonte, 27 de dezembro 2022. Diário do executivo, p 7.

Disponível em: < <http://jornal.iof.mg.gov.br/xmlui/handle/123456789/276763> >. Acesso em 15 de junho de 2023.

MOLDOVEANU, Serban C.; DAVID, Victor. Selection of the HPLC method in chemical analysis. **Elsevier**, 2016.

MOLIMARD, P.; SPINLER, H. E. Review: compounds involves in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 169- 184. 1996.

MOOKHERJEE, A., et al. (2017). Characterization and Synergistic Effect of Antifungal Volatile Organic Compounds Emitted by the *Geotrichum candidum* PF005, an Endophytic Fungus from the Eggplant. **Microbial Ecology**, 75(3), 647–661. doi:10.1007/s00248-017-1065-0.

MOOKHERJEE, Abhirup et al. Characterization and synergistic effect of antifungal volatile organic compounds emitted by the *Geotrichum candidum* PF005, an endophytic fungus from the eggplant. **Microbial ecology**, v. 75, p. 647-661, 2018.

NAZ, S., et al. Aromatic amino acids as precursors of antimicrobial metabolites in *Geotrichum candidum*. **FEMS Microbiology Letters**, 344(1), 39–47, 2013.

NAZ, Saima et al. Aromatic amino acids as precursors of antimicrobial metabolites in *Geotrichum candidum*. **FEMS microbiology letters**, v. 344, n. 1, p. 39-47, 2013.

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

NIELSEN, Marianne S.; FRISVAD, Jens C.; NIELSEN, Per V. Colony interaction and secondary metabolite production of cheese-related fungi in dual culture. **Journal of food protection**, v. 61, n. 8, p. 1023-1029, 1998b.

NIELSEN, Marianne S.; FRISVAD, Jens C.; NIELSEN, Per V. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. **International journal of food microbiology**, v. 42, n. 1-2, p. 91-99, 1998.

NOGUEIRA, Mara Corrêa Lelles; LUBACHEVSKY, Galina; RANKIN, Scott A. A study of the volatile composition of Minas cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 555-563, 2005.

NÚÑEZ, Félix et al. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. **Food microbiology**, v. 46, p. 114-120, 2015.

ONMAZ, Nurhan Ertas et al. Mycotoxigenic and phylogenetic perspective to the yeasts and filamentous moulds in mould-matured Turkish cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 357, p. 109385, 2021.

OSTRY, Vladimir et al. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin research**, v. 33, p. 65-73, 2017.

PADILLA, Beatriz et al. Potential impact of dairy yeasts on the typical flavour of traditional ewes' and goats' cheeses. **International Dairy Journal**, v. 35, n. 2, p. 122-129, 2014.

- PANTELIDES, Iakovos S. et al. Isolation, identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black *aspergilli* on grapes. **Biological control**, v. 88, p. 46-53, 2015.
- PEREZ, María Florencia et al. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. **Biological Control**, v. 115, p. 135-140, 2017.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. 27, 293. 2004.
- 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.
- SCHMIDT-HEYDT, Markus et al. The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. **Food microbiology**, v. 29, n. 2, p. 233-241, 2012.
- SENGUN, I., et al. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. **World Mycotoxin Journal**, 1(3), 291–298, 2008.
- SILVA, J. G. et al. Influência do fermento endógeno nas características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 34, n. 273, p. 7-13, mar./abr. 2013.
- SOBRAL, D. et al. Major defects in artisanal Minas cheese: a review. **Rev. Inst. Laticínios**. v. 72, n. 2, p. 108-120, abr/jun, 2017.
- STOLL, Dominic; SCHMIDT-HEYDT, Markus; GEISEN, Rolf. Differences in the regulation of ochratoxin A by the HOG pathway in *Penicillium* and *Aspergillus* in response to high osmolar environments. **Toxins**, v. 5, n. 7, p. 1282-1298, 2013.
- TARIQ, V. N. et al. Influence of volatile metabolites from *Geotrichum candidum* on other fungi. **Mycological Research**, v. 95, n. 7, p. 891-893, 1991.
- TONIETTO, J. Afinal o que é terroir? **Bom vivant. Flores da Cunha**. v. 8, n. 98, p. 08, abr. 2007.
- UMESHA, Sharanaiah et al. Aflatoxins and food pathogens: Impact of biologically active aflatoxins and their control strategies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 6, p. 1698-1707, 2017.
- VAN DER MERWE, K. J. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, n. 4976, p. 1112-1113, 1965.
- VIRGILI, Roberta et al. Biocontrol of *Penicillium nordicum* growth and ochratoxin A production by native yeasts of dry cured ham. **Toxins**, v. 4, n. 2, p. 68-82, 2012.
- WANG, Yan et al. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 83, 2016.
- YANG, Q. et al. Ochratoxin A is degraded by *Yarrowia lipolytica* and generates non-toxic degradation products. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 2, p. 269-278, 2016.
- ZHANG, X. et al. The mechanisms involved in ochratoxin A elimination by *Yarrowia lipolytica* Y-2. **Annals of Applied Biology**, v. 173, n. 2, p. 164-174, 2018.

ZHENG, X.; SHI, X.; WANG, B. A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 703284, 2021.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### ARTIGO 1

#### **Influência da temperatura e da atividade de água no crescimento e risco de produção de Ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* em meio sintético de queijo**

#### **RESUMO**

O Queijo Minas Artesanal (QMA) pode ser colonizado por *Aspergillus ochraceus* produtor de Ocratoxina A (OTA). Embora ofereça um potencial risco de contaminação, pouco se sabe a respeito da capacidade de produção dessa micotoxina durante o processo de maturação do QMA. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da temperatura e da atividade de água ( $a_w$ ) no crescimento e risco potencial de produção de OTA (ORI) por cepas de *A. ochraceus*, em meio à base de queijo. Foi empregado o Projeto Rotacional Composto Central (DCCR) com  $a_w$  variando de 0,90 a 0,99 e temperaturas de 15 a 35 °C. O crescimento ideal para *A. ochraceus* URMICRO 11727 e 11728 ocorreu em  $a_w$  de 0,94 a 0,99 e temperaturas entre 23 e 32 °C. As condições sob as quais as cepas demonstraram maior índice de risco OTA foi em  $a_w$  acima de 0,93 e temperatura entre 18 e 30 °C. Com os modelos obtidos, foi possível verificar as condições mais favoráveis para a produção de OTA durante a maturação. Os resultados mostraram que entre as condições que oferecem maior risco ORI, a condição 18°C e 0,98  $a_w$ , requer maior atenção, pois corresponde a  $a_w$  do queijo no processo inicial da maturação do QMA. Tais resultados contribuem para a segurança do produto, possibilitando a adoção de estratégias de controle durante a maturação do QMA, de maneira a evitar a contaminação por fungos micotoxigênicos.

**Palavras-chave:** Fungo micotoxigênico. Queijo artesanal. Ocratoxina A. Segurança alimentar. Fatores abióticos.

## 1. INTRODUÇÃO

A Ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário de grande risco à saúde pública, devido aos diversos efeitos tóxicos que pode causar, como carcinogenicidade, teratogenicidade e supressão imunológica (O'CALLAGHAN et al., 2006; WANG et al., 2019). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, essa micotoxina é classificada como um possível carcinógeno humano (grupo 2B) (IARC, 1993). A OTA é sintetizada por algumas espécies pertencentes principalmente aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (WANG et al., 2016) e foi identificada pela primeira vez de *Aspergillus ochraceus* (MERWE et al., 1965) um importante produtor de OTA, frequentemente isolado do café (TANIWAKI et al., 2003), milho (MAGNOLI et al., 2006), arroz (RUADREW et al., 2013) e de vários outros tipos de grãos (PRIYANKA et al., 2014). Apesar de ser mais associado aos substratos mencionados, essa espécie já foi relatada em Queijo Minas Artesanal (QMA) produzido na região da Canastra no Brasil (ARAGÃO et al., 2022). O QMA é um queijo premiado pelo concurso *Mondial du Fromage et des Produits Laitiers* na França (EM, 2017; FIEMG, 2019; G1, 2021), produzido empregando-se leite cru de vaca, sem tratamento térmico prévio, acrescido de coalho, sal, fermento endógeno natural (pingo), e finalmente maturado em prateleiras de madeira (DE SOUZA et al., 2021).

Em geral, a presença de fungos autóctones nos queijos artesanais é importante no estabelecimento de características sensoriais relacionadas à tipicidade do produto (CASQUETE et al., 2017; DE SOUZA et al., 2021). Entretanto, a contaminação por fungos toxigênicos, principalmente durante a fabricação, maturação ou armazenamento, é uma preocupação constante (ANELLI et al., 2019; ONMAZ et al., 2021). Diversos estudos com queijos maturados de várias origens têm relatado a ocorrência de diferentes espécies produtoras de OTA, principalmente os gêneros *Aspergillus*, mais comumente as espécies *A. westerdijkiae* e *A. steynii* (ANELLI et al., 2019), também como gênero *Penicillium*, com *P. verrucosum* (DECONTARDI et al., 2018) e *P. nordicum* (RAMOS-PEREIRA et al., 2019), sendo as espécies mais comumente detectadas. Entretanto, o crescimento de espécies toxigênicas não implica que a micotoxina esteja presente no produto, uma vez que sua biossíntese é modulada por uma diversidade de fatores ecofisiológicos, como a composição do substrato, cepa fúngica, fatores abióticos, tais como temperatura e atividade de água ( $a_w$ ), entre outros (CASQUETE et al., 2017; CASQUETE et al., 2018; HYMERY et al., 2014).

Os queijos artesanais estão sujeitos a modificações em suas características físico-químicas durante a maturação, e conseqüentemente desempenham um importante papel na

dinâmica microbiana, além de influenciar na biossíntese de micotoxinas (CASQUETE et al., 2017). Nesse sentido, como estratégia de prevenção, muitos estudos vêm sendo realizados em diferentes substratos para entender de que maneira fatores abióticos e ainda bióticos regulam o crescimento de diferentes espécies micotoxigênicas e a biossíntese de ocratoxina A (DAS NEVES et al., 2021; PARDO et al., 2004; PARDO et al., 2005), aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (CASQUETE et al., 2017), ácido ciclopiazônico (CASQUETE et al., 2018), fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (CAO et al., 2014), tricoteceno A (VERHEECKE-VAESSEN et al., 2019).

Este é o primeiro estudo avaliando a influência de fatores ecofisiológicos sobre o crescimento e produção de OTA *in vitro*, por cepas de *A. ochraceus* obtidas a partir de queijos artesanais do Brasil. A compreensão de como os fatores abióticos modulam o crescimento de *A. ochraceus* e a produção de OTA é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de controle para evitar a contaminação do QMA.

Nesse sentido, esta pesquisa foi conduzida com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura e da atividade de água ( $a_w$ ) no crescimento e risco potencial de produção de OTA (ORI) por *A. ochraceus*. Para essa avaliação, foi utilizado um meio sintético à base de queijo a fim de representar de maneira similar as condições reais do produto

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cepas fúngicas

Dois isolados toxigênicos foram usados neste estudo (*Aspergillus ochraceus* URMICRO 11727 e 11728), os quais foram isolados anteriormente do Queijo Minas Artesanal produzido na região da Canastra (ARAGÃO et al., 2022) e depositados na Unidade de Recursos Microbiológicos (URMICRO), da Universidade Federal de Lavras, Brasil.

### 2.2 Delineamento rotacional composto central (DCCR)

O DCCR foi usado para duas variáveis independentes: temperatura (X1) e  $a_w$  (X2) com um projeto fatorial de  $2^2$  (quatro pontos fatoriais, quatro pontos axiais e três pontos centrais) (RODRIGUES, 2009). Foi utilizado para avaliar o efeito dos fatores abióticos no crescimento e na produção de OTA, por cepas de *A. ochraceus*, respectivamente. A faixa de temperatura e  $a_w$  foram definidos com base em estudos anteriores (OLIVEIRA et al., 2019; SOUZA et al., 2016). A resposta foi a taxa de crescimento fúngico (mm / dia) e o índice de risco OTA (ORI). As variáveis codificadas foram estabelecidas em cinco níveis (-1,41; - 1; 0; 1; 1,41), com os respectivos valores reais apresentado na Tabela 1. A faixa de temperatura avaliada foi de 15 a

35 °C e  $a_w$  0,90 a 0,99, totalizando 11 ensaios. Os valores obtidos para as variáveis independentes foram analisados no Software Chemoface versão 1.65.

### **2.3 Preparo do meio ágar queijo**

O meio ágar queijo (CA) empregado neste estudo foi preparado seguindo a metodologia de Gori et al. (2012), com modificações. Resumidamente, 200 g/L de queijo comercial pasteurizado (queijo Minas padrão) foi homogeneizado com 400 mL de água destilada por 5 min utilizando um liquidificador. A seguir foi adicionando citrato de tri-sódio di-hidratado (12,5 g / L) e a mistura foi aquecida em banho-maria com agitação manual até a dissolução. O volume foi ajustado para 1000 mL e, a seguir, a atividade de água ( $a_w$ ) do meio CA foi ajustada para 0,99; 0,98; 0,95; 0,91 e 0,90, pela adição de 51, 130, 195, 380 e 400 mL de glicerol (Scharlab SL, Barcelona, Espanha) respectivamente. Os valores de  $a_w$  foram verificados usando o AquaLab CX-2 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA). Foi aferido com pHmetro e confirmado o valor de pH do meio, em torno de 5.5. Subsequentemente, foi adicionado 20 g de ágar (Merck, São Paulo, Brazil), seguido por esterilização a 121 °C por 10 min.

### **2.4 Reativação dos isolados e inoculação em ágar queijo**

Para o preparo do inóculo, os isolados foram inicialmente cultivados em meio Malt Yeast Extract Agar (MEA) (extrato de malte, 20 g/L; peptona bacteriológica, 1 g/L; glicose, 20 g/L e ágar, 15 g/L) e incubado por 7 dias a 25°C. As suspensões de esporos foram preparadas de acordo com Das Neves et al. (2021). Resumidamente, foram adicionados 10 mL de água destilada estéril contendo Tween 80 a 0,1% e, em seguida, filtrado através de gaze estéril. A concentração final de esporos foi padronizada para  $10^6$  esporos / mL, utilizando a câmara de Neubauer.

Uma alíquota de 10 µL da suspensão de esporos foi inoculado no centro de placas de Petri contendo 20 mL de meio CA em diferentes condições de  $a_w$ , e incubados em uma faixa de temperatura entre 15 e 35 °C, conforme definido pelo DCCR.

### **2.5 Avaliação do crescimento fúngico e quantificação de OTA**

O diâmetro da colônia de *A. ochraceus* foi mensurado com o auxílio de um paquímetro em 2 direções perpendiculares a cada 48 horas ao longo de 12 dias. Os diâmetros (mm) foram plotados contra o tempo (dias), e a taxa de crescimento das colônias foi determinado a partir da inclinação da curva de crescimento, estimado por regressão linear (GIL-SERNA et al., 2014; CASQUETE et al, 2018).

A OTA foi extraída e analisada de acordo com Passamani et al. (2014). Resumidamente, três plugs foram removidos do centro, meio e borda de cada colônia no 12º dia de crescimento no meio CA e colocados em tubos de ensaio com tampa e, em seguida, 1 mL de metanol puro foi adicionado. Os tubos foram homogeneizados vigorosamente por 5 segundos e mantidos, a 25 °C, por 60 minutos. Os extratos foram filtrados em membranas de politetrafluoretileno (0,22 µm; Millipore Corp., Billerica, MA) e analisado em um sistema de HPLC equipado com um detector de fluorescência RF-10 AXL ( $\lambda_{exc}$  330 nm;  $\lambda_{em}$  460 nm). A coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm) foi usada.

A concentração de OTA nas amostras foi determinada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear, correlacionando a área do pico versus a concentração da respectiva solução padrão.

## 2.6 Cálculo do índice de risco ORI

Os resultados da produção de OTA foram avaliados em relação ao índice de risco (ORI) proposto por Gil-Serna et al. (2014), que relaciona o crescimento do fungo com a produção de OTA *in vitro* ao final do experimento (12 dias de incubação). O ORI foi calculado a partir da Equação 1:

$$ORI = \log [concentração\ OTA\ (\mu g / mm^2) \times superfície\ da\ colônia\ (mm^2) + 1] \quad (1)$$

## 3. RESULTADOS

Os efeitos da temperatura e  $a_w$  na taxa de crescimento e no índice de risco de OTA (ORI) de *A. ochraceus* URMICRO 11727 e 11728 foram avaliados usando o DCCR. A taxa de crescimento dos isolados variou de 1,90 a 6,21 mm / dia (Tabela 1). *A. ochraceus* URMICRO 11727 e 11728 apresentaram o maior crescimento de 6,13 e 6,09 mm / dia (média do ponto central), à 25 °C e 0,95  $a_w$ , respectivamente. Ambas as cepas foram capazes de desenvolver em todas as condições testadas, embora tenha apresentado crescimento radial retardado no ensaio 1 (18 °C e 0,91  $a_w$ ).

A concentração de OTA variou de 0 a 16,03 µg / g e os valores de ORI entre 0 e 2,27 (Tabela 1). A cepa URMICRO 11727 apresentou a maior produção de OTA e risco de contaminação ORI, com destaque para as condições 0,99  $a_w$  à 25 °C; 0,98  $a_w$  à 18 °C, seguido por 0,95  $a_w$  à 25 °C. Sob estresse osmótico (0,91  $a_w$ ), as cepas URMICRO 11727 e 11728 não apresentaram produção de OTA e risco de contaminação à 18 °C e 32 °C.

**Tabela 1.** Desenho da matriz e resultados obtidos da taxa de crescimento de cada isolado fúngico em meio à base de queijo e seu respectivo índice de risco OTA (ORI) avaliado pelo DCCR.

Exp.	Variáveis		Taxa de crescimento (mm / dia)		OTA (µg / g)		ORI	
	T (°C)	a <sub>w</sub>	11727	11728	11727	11728	11727	11728
1	-1 (18)	-1 (0,91)	1,90	2,10	ND	ND	0,00	0,00
2	-1 (18)	+1 (0,98)	4,63	4,17	7,18	6,56	1,72	1,69
3	+1 (32)	-1 (0,91)	2,36	2,80	ND	ND	0,00	0,00
4	+1 (32)	+1 (0,98)	5,85	5,85	0,06	0,07	0,22	0,21
5	-1,41 (15)	0 (0,95)	2,10	2,40	0,03	0,03	0,02	0,02
6	+1,41 (35)	0 (0,95)	4,07	4,59	2,03	0,44	1,15	0,55
7	0 (25)	-1,41 (0,90)	2,30	2,35	0,64	0,48	0,34	0,34
8	0 (25)	+1,41 (0,99)	5,15	5,04	16,03	7,17	2,27	1,87
9	0 (25)	0 (0,95)	6,21	6,06	6,43	5,32	2,01	1,78
10	0 (25)	0 (0,95)	6,04	6,03	6,10	5,59	1,86	1,84
11	0 (25)	0 (0,95)	6,14	6,19	6,29	5,15	1,92	1,82

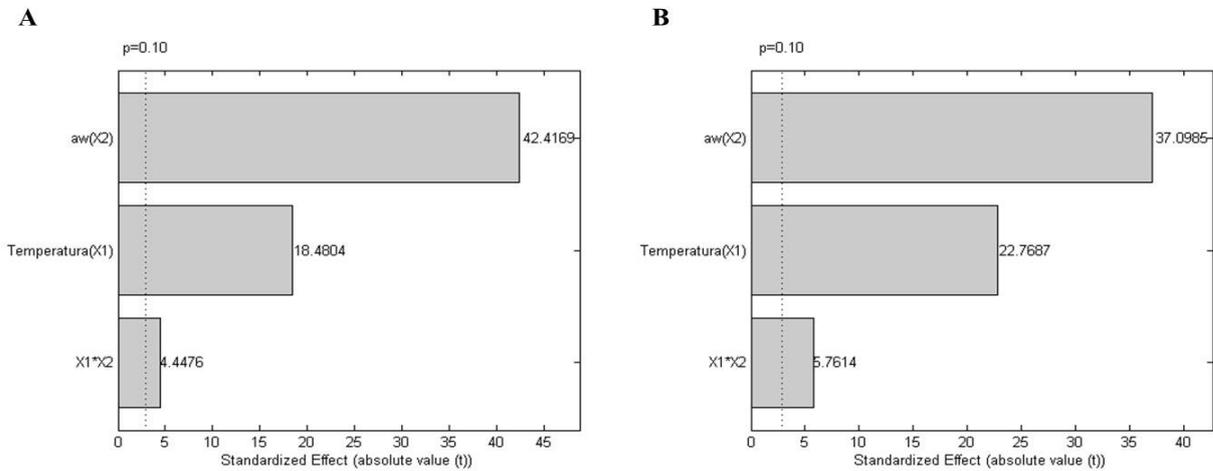
Variáveis codificadas, -1,41; -1; 0; +1; +1,41; variáveis reais estão entre parênteses; a<sub>w</sub>: atividade de água; T (°C): temperatura; 11727: *Aspergillus ochraceus* URMICRO 11727; 11728: *Aspergillus ochraceus* URMICRO 11728; ND: não detectou.

Fonte: Do autor (2023).

### 3.1 Efeito da temperatura e a<sub>w</sub> na taxa de crescimento

De acordo com o diagrama de Pareto (Fig. 1) os efeitos da temperatura e a<sub>w</sub> foram estatisticamente significativos ( $p \leq 0.1$ ), e o tipo de efeito (sinérgico ou antagônico) sobre o crescimento foi semelhante entre as cepas. A a<sub>w</sub> teve maior efeito sinérgico sobre o crescimento de *A. ochraceus* (Fig. 1.A e 1.B), com maior significância para a cepa URMICRO 11727. Ou seja, quanto mais alto a<sub>w</sub>, maior o crescimento dos fungos. Os resultados indicam que a interação entre temperatura e a<sub>w</sub> foi significativamente sinérgico para URMICRO 11727 e 11728.

**Figura 1.** Diagrama de Pareto ilustrando os efeitos da temperatura, atividade de água ( $a_w$ ) e suas interações na taxa de crescimento micelial de *A. ochraceus* URMICRO 11727 (A) e URMICRO 11728 (B). Valores positivos indicam sinergia e valores negativos indicam antagonismo. Linha pontilhada, a 10% de probabilidade significativa.



Fonte: Do autor (2023).

Os resultados experimentais de cada teste foram usados para calcular os coeficientes de regressão e a construção de modelos matemáticos. Os modelos obtidos para o crescimento são apresentados na Tabela 2, com os respectivos parâmetros estatísticos e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Os valores sugerem que o modelo se ajustou adequadamente aos dados experimentais quadráticos ( $R^2 > 0.90$ ), explicando 97 e 98% da variabilidade na resposta por URMICRO 11727 e 11728, respectivamente. Os valores de p sugerem regressões significativas ( $p \leq 0,1$ ). Além disso, o valor de F calculado é maior do que o valor de F tabelado ( $F_{0,90\ 5; 5} = 3,45$ ), indicando que o modelo é preditivo.

**Tabela 2.** Modelos previstos para o crescimento micelial e ORI dos isolados avaliados.

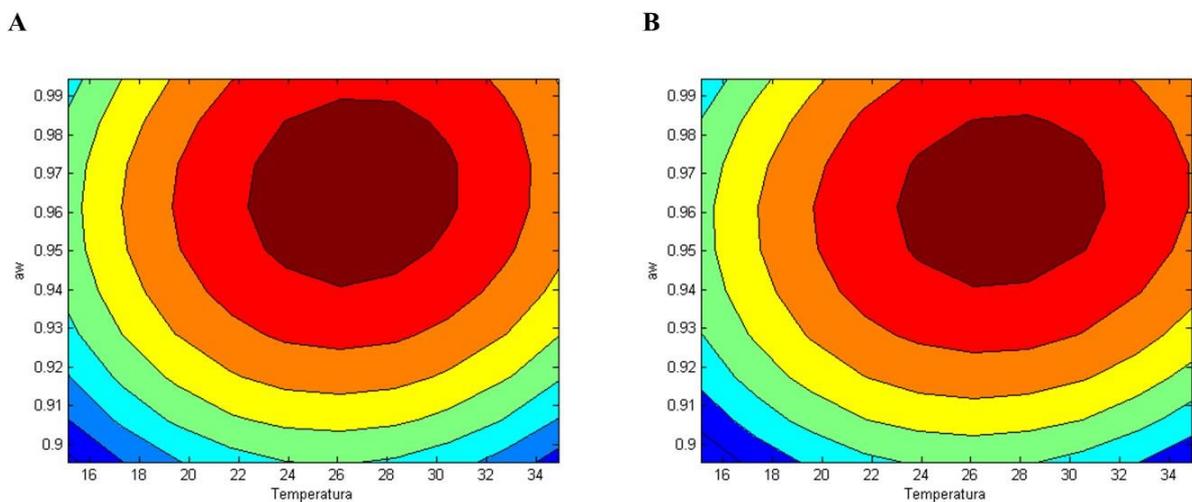
Fungos	Modelo previsto	$R^2$	F-valor	p-valor
URMICRO 11727	$\text{Cres} = -856,2677 + 0,8290T - 0,0296T^2 + 1,7645e^{+3}a_w - 924,5015a_w^2 + 0,7755Ta_w$	0,97	33,3075	$7,6353e^{-4}$
URMICRO 11727	$\text{ORI} = -371,7328 + 2,2517T - 0,0161T^2 + 714,5277a_w - 348,9872a_w^2 - 1,5306Ta_w$	0,80	4,1048	0,0737
URMICRO 11728	$\text{Cres} = -868,5870 + 0,4440T - 0,0258T^2 + 1,8050e^{+3}a_w - 951,3735a_w^2 + 1,0000Ta_w$	0,98	81,0530	$8,7916e^{-5}$
URMICRO 11728	$\text{ORI} = -355,9908 + 2,2500T - 0,0167T^2 + 683,5657a_w - 334,0196a_w^2 - 1,5102Ta_w$	0,90	9,1160	0,0150

Cres: taxa de crescimento (mm / dia), ORI: índice de risco OTA, T - Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $a_w$  - atividade de água. p-valor  $\leq 0,1$ , estatisticamente significativo.

Fonte: Do autor (2023).

Os modelos gerados foram utilizados para construir as superfícies de resposta (Fig. 2), que preveem as condições ótimas de temperatura e  $a_w$  que favorecem o crescimento do *A. ochraceus*. Os resultados sugerem, que ambas as cepas de *A. ochraceus* (Fig. 2.A e 2.B), apresentam a maior taxa de crescimento em condições semelhantes, com temperatura entre 23 e 32 °C e um  $a_w$  entre 0,94 e 0,99.

**Figura 2.** Superfície de resposta para taxa de crescimento em função da temperatura e atividade de água ( $a_w$ ) para *Aspergillus ochraceus* URMICRO 11727 (A) e *Aspergillus ochraceus* URMICRO 11728 (B).

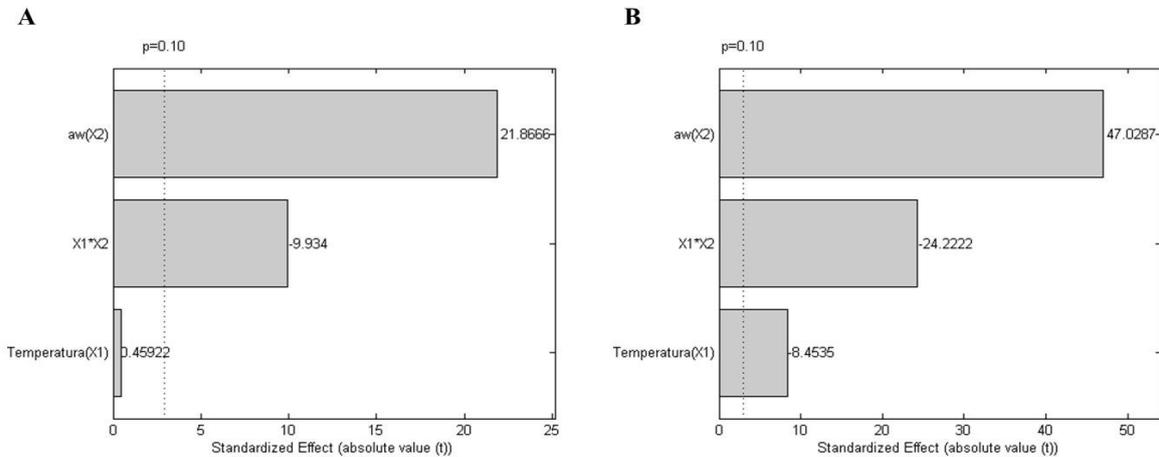


Fonte: Do autor (2023).

### 3.2 Efeito da temperatura e $a_w$ no índice de risco OTA (ORI)

Os efeitos da  $a_w$  foram estatisticamente significativos ( $p \leq 0,1$ ) no ORI, como demonstrado pelo diagrama de Pareto (Fig. 3), proporcionando efeitos sinérgicos para URMICRO 11727 e 11728. A interação entre temperatura e  $a_w$  teve um efeito antagônico no ORI para URMICRO 11727 e 11728.

**Figura 3.** Diagrama de Pareto ilustrando os efeitos da temperatura, atividade de água ( $a_w$ ) e suas interações no índice de risco ORI de *A. ochraceus* URMICRO 11727 (A) e URMICRO 11728 (B). Valores positivos indicam sinergia e valores negativos indicam antagonismo. Linha pontilhada, a 10% de probabilidade significativa.

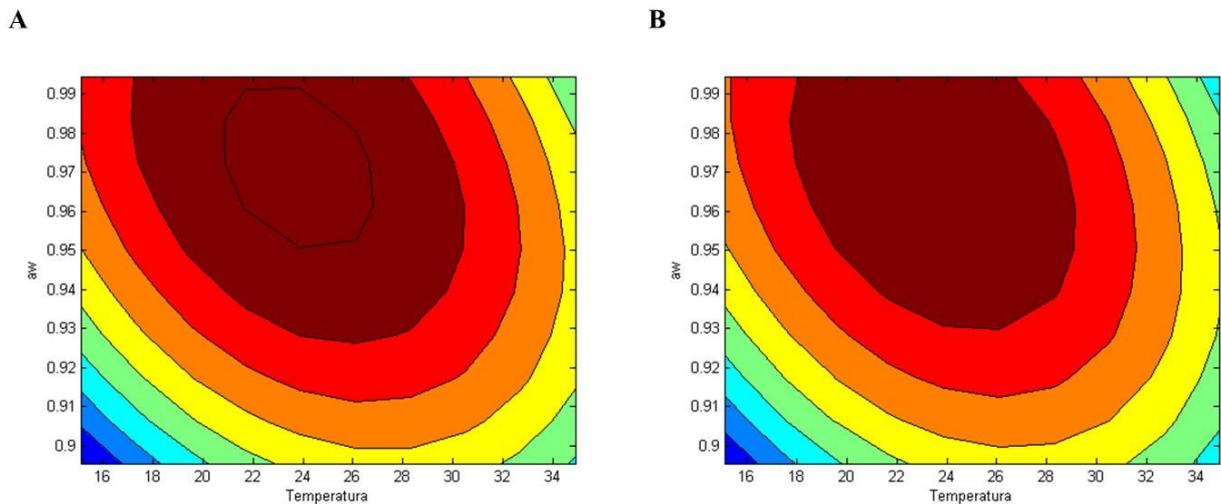


Fonte: Do autor (2023).

A partir dos resultados obtidos para ORI, foram calculados os coeficientes de regressão e a construção de modelos matemáticos (Tabela 2), com os respectivos parâmetros estatísticos e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Os valores sugerem que o modelo se ajustou adequadamente aos dados experimentais quadráticos ( $R^2 > 0,80$ ), explicando 80 e 90% da variabilidade na resposta por URMICRO 11727 e 11728, respectivamente. Os valores de p sugerem regressões significativas ( $p \leq 0,1$ ). Além disso, o valor de F calculado é maior do que o valor de F tabelado ( $F_{0,90 \ 5; \ 5} = 3,45$ ), indicando que o modelo é preditivo.

De acordo com as superfícies de resposta (Fig. 4), é possível prever as melhores condições de temperatura e  $a_w$  que oferecem maior risco de contaminação por OTA (ORI). Os resultados sugerem que as cepas URMICRO 11727 e 11728 (Fig. 4.A e 4.B), apresentaram maior ORI em  $a_w$  acima de 0,93 e temperatura entre 18 e 30 °C.

**Figura 4.** Superfície de resposta gerada por ORI em função da temperatura e atividade de água ( $a_w$ ) para *Aspergillus ochraceus* URMICRO 11727 (A) e *Aspergillus ochraceus* URMICRO 11728 (B).



Fonte: Do autor (2023).

#### 4. DISCUSSÃO

O crescimento fungico e os níveis de produção de micotoxinas são modulados de formas diferentes dependendo da composição do substrato, da influência de fatores abióticos, tais como temperatura e  $a_w$ , e ainda pela cepa fúngica (HYMERY et al., 2014; CASQUETE et al., 2017; CASQUETE et al., 2018). No presente estudo as linhagens de *A. ochraceus* apresentaram um crescimento semelhante em meio de cultura à base de queijo e foram capazes de se desenvolver em todas as condições de  $a_w$  e temperatura testadas. O crescimento ótimo previsto pelo modelo para *A. ochraceus*, encontra-se dentro da faixa já observada para essa espécie em outros substratos, como em grãos de cevada à 30 °C e 0,99  $a_w$  (PARDO et al., 2004), em meio sintético de uva à 30 °C e 0,98  $a_w$  (PARDO et al. 2005) e em meio sintético de café à 26 °C e 0,95  $a_w$  (DAS NEVES et al., 2021).

A correlação da taxa de crescimento com a produção de micotoxinas, sugere que o crescimento de espécies fúngicas em um substrato não implica necessariamente na biossíntese da micotoxina (GIL-SERNA et al., 2014). Estudos anteriores relataram que a produção de OTA não ocorre em todas as condições favoráveis para o desenvolvimento fúngico (OLIVEIRA et al., 2019; RAMOS et al., 1998; SOUZA et al., 2016). De fato, neste estudo não observamos produção de OTA sob estresse osmótico (0,91  $a_w$ ) à 18 °C e 32 °C.

Embora as cepas de *A. ochraceus* apresentem crescimento semelhante nas mesmas condições de temperatura e  $a_w$ , os níveis de produção de OTA, é cepa dependente. Neste estudo,

a máxima produção de OTA foi alcançada em altos valores de  $a_w$ , exibindo maior ORI à 25 °C e 0,99  $a_w$ , corroborando com os resultados semelhantes obtidos por Souza et al. (2016), em meio de cultura à base de café. Por outro lado, em outros estudos com meio de café, Das Neves et al. (2021), mostrou que as condições mais favoráveis para o maior ORI por *A. ochraceus* foram em 0,98  $a_w$  à 21 °C, enquanto Oliveira et al. (2019), relata a influência da cepa fúngica, exibindo maior ORI nas condições 0,98  $a_w$  à 20 °C e 0,95 à 27,5 °C.

Neste trabalho, o risco de contaminação ORI à 18 °C e 0,98  $a_w$  por *A. ochraceus*, corresponde à condição de  $a_w$  no início da maturação do QMA (DORES et al, 2013; Martins et al., 2015). Nessa etapa, o produtor deve ter maior cuidado para evitar a contaminação por fungos toxigênicos, principalmente *A. ochraceus*, já detectado no QMA (Aragão et al., 2022).

A média anual de temperatura para algumas regiões produtoras de QMA, como a região do Serro em Minas Gerais, varia em média de 15 °C a 29 °C, com máxima de 28 °C e mínima de 15 °C no inverno, e máxima de 29 °C e mínima de 20 °C no verão. Já em São Roque de Minas, na Serra da Canastra, ao longo do ano a temperatura varia em média de 12 °C a 28 °C, com máxima de 24 °C e mínima de 12 °C no inverno e máxima de 28 °C e mínima de 18 °C no verão (WEATHER SPARK, 2023). Embora a maioria dos produtores de QMA realizem a maturação em temperatura ambiente, já existem propriedades empregando a climatização nesse processo, entre 18 e 20 °C. Essa temperatura tem correspondência com a faixa favorável para o crescimento e risco ORI, conforme observado neste estudo. Embora seja uma condição de risco, ressalta-se que a taxa de crescimento do fungo e risco ORI são reduzidos em temperaturas baixas e  $a_w$  inferiores à 0,92, previsto pelo modelo gerado no presente estudo. Considerando que ao longo da maturação ocorre uma redução da  $a_w$  no QMA (DORES et al, 2013; JESUS et al., 2020; MARTINS et al., 2015), com 0,92  $a_w$  na casca com apenas 14 dias de maturação (JESUS et al., 2020), inferimos que os níveis de segurança do produto são intensificados.

Uma possível estratégia de controle seria estimular o desenvolvimento de espécies autóctones benéficas que poderão inibir o desenvolvimento de espécies micotoxigênicas, sem alterar o sabor típico do queijo (BIAGIOTTI et al., 2018). Espécies autóctones detectadas em QMA, como *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida catenulata*, *Candida zeylanoides*, *Geotrichum candidum* e *Yarrowia lipolytica* (SOUZA et al., 2021; ARAGÃO et al., 2021), já foram estudadas em diferentes substratos e condições como espécies antagônicas, atuando na inibição de fungos deteriorantes e / ou micotoxigênicos (DECKER et al., 2005; MEDINA-CÓRDOVA et al., 2018; MOOKHERJEE et al., 2018; NIELSEN et al., 1998; NÚÑEZ et al., 2015; PEREZ et al., 2017; VIRGILI et al., 2012; YANG et al., 2016). O estudo

do papel que essas espécies exercem no controle de fungos toxigênicos no QMA vem sendo estudado pelo nosso grupo de pesquisa afim de garantir a qualidade e segurança do produto.

## **5. CONCLUSÃO**

Conclui-se que o crescimento fúngico e o risco de produção de OTA (ORI) são afetados por condições de temperatura e  $a_w$  no meio à base de queijo. A condição de risco, a qual requer maior atenção, corresponde ao início da maturação com 0,98  $a_w$ . Compreender as condições que estimulam ou limitam seu desenvolvimento e produção de OTA é imprescindível em termos de segurança alimentar. Através dos resultados obtidos é possível prever e implementar estratégias de controle que evitem a contaminação e a produção de OTA.

## REFERÊNCIAS

- ANELLI, Pamela, et al. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. **Food microbiology**, 78, 62-72, 2019.
- ARAGÃO, M. O., et al. Fungal community and physicochemical profiles of ripened cheeses from the Canastra of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Food Science and Technology*, 59(12), 4685-4694, 2022.
- BIOGIOTTI, C., et al. Occurrence and involvement of yeast biota in ripening of Italian Fossa cheese. **European Food Research and Technology**, 244(11), 1921-1931, 2018.
- CAO, A., et al. Critical environmental and genotypic factors for *Fusarium verticillioides* infection, fungal growth and fumonisin contamination in maize grown in northwestern Spain. **International Journal of Food Microbiology**, 177, 63-71, 2014.
- CASQUETE, R., et al. Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. **LWT**, 89, 179-185, 2018.
- CASQUETE, R., et al. The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors. **Journal of dairy science**, 100(9), 6987-6996, 2017.
- DAS NEVES, T. T., et al. Simulation of coffee beans contamination by *Aspergillus* species under different environmental conditions and the biocontrol effect by *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT**, 148, 111610, 2021.
- DE SOUZA, T. P., et al. Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. **International Dairy Journal**, 120, 105085, 2021.
- DECKER, M., & NIELSEN, P. V. The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated fungi of white mould cheese. **International Journal of Food Microbiology**, 104(1), 51–60, 2005.
- DORES, M. T. D., NOBREGA, J. E. D., & FERREIRA, C. L. D. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology**, 33(1), 180-185, 2013.
- EM- Estado de Minas. (2017). Queijo mineiro é premiado na França. [https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2017/06/14/internas\\_economia,876364/queijo-mi-neiro-e-premiado-na-franca.shtml](https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2017/06/14/internas_economia,876364/queijo-mi-neiro-e-premiado-na-franca.shtml). (Accessed 2 July 2020).
- FIEMG - Federação das Indústrias do Estado de Minas Gerais. (2019). Queijos mineiros são premiados em concurso na França. <https://www7.fiemg.com.br/noticias/detalhe/queijos-mineiros-sao-premiados-em-concurso-na-franca>. (Accessed 15 July 2020).
- G1- Globo. (2021) Queijo brasileiro fica em segundo lugar em quantidade de medalhas em concurso mundial da França. <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2021/09/14/queijo-brasileiro-fica-em-segundo-lugar-em-quantidade-de-medalhas-em-concurso-mundial-da-franca.ghtml>. (Accessed 10 July 2023).

GIL-SERNA, J., et al. Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. **Food research international**, 61, 127-131, 2014.

GORI, K., et al. *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. **MicrobiologyOpen**, 1, 16–168, 2012.

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

JESUS, J. C. D., et al. Quick identification of the time of maturation of artisanal minas cheese by FTIR-ATR spectroscopy and multivariate techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 31, 2000-2011, 2020.

MAGNOLI, C., et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. **Mycopathologia**, 161, 53-58, 2006.

MARTINS, J. M., et al. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, 46, 219-230, 2015.

MEDINA- CORDOVA, N., et al. The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. **Biological Control**, 121, 216–222, 2018.

MERWE, K. V. D., et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, 205, 1112-1113, 1965.

MOOKHERJEE, A., et al. Characterization and synergistic effect of antifungal volatile organic compounds emitted by the *Geotrichum candidum* PF005, an endophytic fungus from the eggplant. **Microbial ecology**, 75(3), 647-661, 2018.

NILSEN, M. S., FRISVAD, J. C., & NILSEN, P. V. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. **International journal of food microbiology**, 42(1-2), 91-99, 1998.

NÚÑEZ, F., et al. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic *penicillia* in dry-fermented sausages. **Food Microbiology**, 46, 114–120, 2015.

O'CALLAGHAN, J., STAPLETON, P. C., & DOBSON, A. D. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. **Fungal Genetics and Biology**, 43(4), 213-221, 2006.

OLIVEIRA, G., et al. Influence of temperature and water activity on Ochratoxin A production by *Aspergillus* strain in coffee south of Minas Gerais/Brazil. **LWT**, 102, 1-7, 2019.

ONMAZ, N. E., et al. Mycotoxigenic and phylogenetic perspective to the yeasts and filamentous moulds in mould-matured Turkish cheese. **International Journal of Food Microbiology**, 357, 109385, 2021.

PARDO, E., et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, 10(1), 45-49, 2004.

- PARDO, E., et al. Effect of water activity and temperature on mycelial growth and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* on irradiated green coffee beans. **Journal of food protection**, 68(1), 133-138, 2005.
- PASSAMANI, F. R. F., et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin a by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. **Journal of Food Protection**, 77(11), 1947–1952, 2014.
- PEREZ, M. F., et al. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. **Biological Control**, 115, 135-140, 2017.
- Priyanka, S. R., Venkataramana, M., Kumar, G. P., Rao, V. K., Murali, H. C. S., & Batra, H. V. (2014). Occurrence and molecular detection of toxigenic *Aspergillus* species in food grain samples from India. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3), 537-543.
- RAMOS, A. J., et al. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **International journal of food microbiology**, 44(1-2), 133-140, 1998.
- RAMOS-PEREIRA, J., et al. Polyphasic identification of *Penicillium spp.* isolated from Spanish semi-hard ripened cheeses. **Food Microbiology**, 84, 103253, 2019.
- RODRIGUES, M. I., & IEMMA, A. F. (2009). **Experimental design and process optimization** (2<sup>nd</sup> ed.). Campinas: Carita Editora.
- RUADREW, S., CRAFT, J., & AIDOO, K. Occurrence of toxigenic *Aspergillus spp.* and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. **Food and chemical toxicology**, 55, 653-658, 2013.
- SOUZA, S. C., et al. Effects of temperature and incubation time on growth and ochratoxin a biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in grain-based media. **African Journal of Microbiology Research**, 10(32), 1306–1314, 2016.
- TANIWAKI, M.H., PITT, J.I., TEIXEIRA, A.A., IAMANAKA, B.T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, 82, 173-179, 2003.
- VERHEECKE-VAESSE Nerheecke-Vaessen, C., et al. Interacting climate change environmental factors effects on *Fusarium langsethiae* growth, expression of TRI genes and T-2/HT-2 mycotoxin production on oat-based media and in stored oats. **Fungal biology**, 123(8), 618-624, 2019.
- VIRGILI, R., et al. Biocontrol of *Penicillium nordicum* growth and ochratoxin A production by native yeasts of dry cured ham. **Toxins**, 4(2), 68–82, 2012.
- WANG, G., et al. Requirement of LaeA, VeA, and VelB on asexual development, ochratoxin A biosynthesis, and fungal virulence in *Aspergillus ochraceus*. **Frontiers in microbiology**, 10, 2759, 2019.
- WANG, Y., et al. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. **Toxins**, 8(3), 83, 2016.
- WEATHER SPARK. **The weather year round anywhere on Earth**, 2023. Disponível em: <<https://weatherspark.com/>>. Acesso em: 24/08/2023.

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

## ARTIGO 2

### **O papel dos fungos autóctones na inibição do crescimento de *Aspergillus ochraceus* e redução do risco de produção de Ocratoxina A no Queijo Minas Artesanal.**

#### RESUMO

Durante a maturação do Queijo Minas Artesanal (QMA), espécies fúngicas indesejáveis podem se desenvolver, como *Aspergillus ochraceus* URMICRO 11727 potencial produtor de Ocratoxina A (OTA). Embora ofereça potencial risco de contaminação, pouco se sabe a respeito do crescimento de *A. ochraceus* e produção de OTA na presença de espécies fúngicas autóctones concorrentes. Compreender o potencial antagonista exercido pela micobiota autóctone contra *A. ochraceus* é fundamental para garantir a qualidade e segurança do produto. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos avaliar a eficiência de fungos autóctones no controle do crescimento de *A. ochraceus* e risco potencial de produção de OTA (ORI) em meio de cultura à base de queijo, bem como determinar os mecanismos antagônicos envolvidos. Os resultados mostraram que todas as espécies autóctones testadas exerceram efeito antagonista no co-cultivo. As maiores taxas de inibição foram encontradas empregando *Geotrichum candidum* URMICRO 11726 como espécie antagonista, com 88,37% e 100% de redução nas condições 0,98  $a_w$  / 18 °C e 0,99  $a_w$  / 25 °C, respectivamente. O risco de produção de OTA também foi significativamente reduzido, com destaque para *Yarrowia lipolytica* URMICRO 2062, que inibiu completamente o risco de produção de OTA em todas as condições avaliadas. O efeito de compostos orgânicos voláteis (COVs) e solúveis produzido pelas espécies antagonistas foi avaliado. Observamos a redução do crescimento e da esporulação de *A. ochraceus* URMICRO 11727 pela produção COVs, com destaque para a espécie antagonista *G. candidum* URMICRO 11726, que exerceu efeito fungicida nas condições 0,98  $a_w$  / 18 °C e 0,99  $a_w$  / 25 °C. A inibição do crescimento de *A. ochraceus* URMICRO 11727 provavelmente foi baseada em efeitos sinérgicos de fatores como a competição por nutrientes e espaço e produção de COVs. Os principais COVs com propriedades antifúngicas já relatadas foram 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e 2-feniletanol, conforme detectado pela análise de Headspace-Microextração em Fase Sólida acoplada à Cromatografia Gasosa com detector de Espectrometria de Massas (HS-SPME-GC-MS). Conclui-se que a presença de espécies autóctones no QMA confere proteção, sem alterar a tipicidade do produto.

**Palavras-chave:** Queijo artesanal. Biocontrole. Fungo micotoxigênico. Compostos orgânicos voláteis. Ocratoxina A.

## 1. INTRODUÇÃO

Os queijos são reconhecidamente importantes nos diferentes setores agroindustriais e em diferentes países do mundo. No Brasil, Minas Gerais é considerado o principal estado produtor (BEMFEITO et al., 2016; MARTINS et al., 2015), com destaque internacional para a produção do Queijo Minas Artesanal (QMA), reconhecido pelo concurso *Mondial du Fromage et des Produits Laitiers* na França (EM, 2017; FIEMG, 2019; G1, 2021). Este queijo é produzido empregando-se leite cru de vaca, sem tratamento térmico prévio, acrescido de coalho, sal, fermento endógeno natural (pingo) (DE SOUZA et al., 2021), e são finalmente maturados por um período mínimo de 14, 17 ou 22 dias, de acordo com a região produtora, conforme estabelecido pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) (IMA, 2021).

A maturação do QMA ocorre em prateleiras de madeira, sem controle de temperatura e umidade, explorando a micobiota que ocorre naturalmente no ambiente de maturação (DE SOUZA et al., 2021). Os fungos autóctones que colonizam os queijos artesanais atribuem características físico-químicas, reológicas e sensoriais importantes (ANELLI et al., 2019; ARAÚJO-RODRIGUES et al., 2020). Portanto, o sabor e aroma do queijo é atribuído a um equilíbrio complexo entre diversos compostos voláteis e não voláteis, que refletem nas características finais do produto (PADILLA et al., 2014). Os compostos voláteis aromáticos incluem álcoois, ácidos, ésteres, aldeídos e cetonas; e as substâncias não voláteis responsáveis pelo sabor são principalmente ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares redutores, nucleotídeos e polipeptídeos. A presença destes compostos é associada a diferentes fatores durante a produção do queijo, incluindo clima, condições regionais, condições de maturação, bem como o próprio metabolismo da micobiota autóctone associada ao queijo (ZHENG et al., 2021).

Estudos avaliando a diversidade micológica associada ao QMA relataram a prevalência de espécies importantes na determinação das características sensoriais típicas. De Souza et al. (2021) destaca a presença de *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* e *Candida zeylanoides* para a qualidade do QMA produzido na região do Serro, enquanto Aragão et al. (2022) destaca *G. candidum* e *Candida catenulata* como espécies promissoras na determinação das propriedades organolépticas do QMA produzido na Canastra.

Durante a maturação de queijos artesanais, espécies fúngicas indesejáveis podem se desenvolver na superfície do produto. Dentre os contaminantes, algumas espécies são potencialmente perigosas para os consumidores, pois são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos, conhecidos como micotoxinas (CAMARDO LEGGIERI et al., 2020;

SENGUN et al., 2008; UMESHA et al., 2016). Diversos estudos com queijos maturados de várias origens têm relatado a ocorrência de espécies micotoxigênicas, pertencente principalmente aos gêneros *Penicillium* (DECONTARDI et al., 2018; KURE et al., 2001; RAMOS-PEREIRA et al., 2019) e *Aspergillus* (ANELLI et al., 2019; DECONTARDI et al., 2018; KANDASAMY et al., 2020). No Brasil, *Aspergillus ochraceus* potencial produtor de ocratoxina A (OTA) já foi detectado no QMA (ARAGÃO et al., 2022). Entretanto, a presença da espécie micotoxigênica não implica que a micotoxina esteja presente no queijo, uma vez que a biossíntese é modulada por fatores abióticos, como pH, atividade de água ( $a_w$ ), temperatura e ainda fatores bióticos, pela interação da própria microbiota prevalente no queijo (HYMERY et al., 2014).

Há relatos de que a presença de certos microrganismos concorrentes restringe o crescimento dos fungos micotoxigênicos e a produção de micotoxinas (SENGUN et al., 2008), seja por mecanismos de competição por nutrientes e espaço, ou produzindo certos compostos orgânico voláteis antifúngicos (COVs) ou solúveis (MOOKHERJEE et al., 2018; NAZ et al., 2013; NÚÑEZ et al., 2015). De fato, espécies fúngicas comumente encontradas em queijos artesanais, inclusive no QMA, como *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida catenulata* e *Candida zeylanoides* (ARAGÃO et al., 2022; BANJARA et al., 2015; BORELLI et al., 2006; CARDOSO et al., 2015; DE SOUZA et al., 2021; FADDA et al., 2004; LOPANDIC et al., 2006), apresentam um potencial bioprotetor em diferentes substratos e condições, capaz de inibir fungos deteriorantes e / ou micotoxigênicos por diferentes mecanismos de controle (DECKER et al., 2005; GHANBARI et al., 2019; MEDINA-CÓRDOVA et al., 2018; MOOKHERJEE et al., 2018; NIELSEN et al., 1998; NÚÑEZ et al., 2015; PEREZ et al., 2017; VIRGILI et al., 2012; YANG et al., 2016).

Diante da possibilidade de crescimento de fungos micotoxigênicos em queijos artesanais, é fundamental estimular o desenvolvimento de espécies autóctones benéficas que, além de desenvolverem características sensoriais, possam inibir o desenvolvimento de espécies micotoxigênicas, sem alterar o sabor típico do produto (BIAGIOTTI et al., 2018).

Pouco se sabe sobre o papel exercido pela microbiota autóctone em QMA, enquanto bioprotetores naturais do *terroir*. Estudos que permitem avaliar o seu potencial antagonista contra espécies micotoxigênicas é fundamental para garantir a qualidade e segurança do produto.

Considerando-se o exposto, esta pesquisa foi conduzida com o objetivo de avaliar a eficiência de fungos autóctones no controle do crescimento de *A. ochraceus* e risco potencial

de produção de OTA (ORI) em meio de cultura à base de queijo, bem como determinar os mecanismos antagônicos envolvidos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Cepas fúngicas**

O *Aspergillus ochraceus* (URMICRO 11727) produtor de OTA foi utilizado neste estudo; e como agentes de biocontrole foram empregadas seis espécies fúngicas, *Geotrichum candidum* (URMICRO 11726), *Kluyveromyces lactis* (URMICRO 2068), *Candida catenulata* (URMICRO 2069), *Yarrowia lipolytica* (URMICRO 2062), *Debaryomyces hansenii* (URMICRO 2060) e *Candida zeylanoides* (URMICRO 2061). Esses fungos foram previamente isolados do Queijo Minas Artesanal produzidos nas regiões da Canastra e do Serro (ARAGÃO et al., 2022; DE SOUZA et al., 2021) e foram obtidos da Unidade de Recursos Microbiológicos (URMICRO), na Universidade Federal de Lavras, Brasil.

### **2.2 Preparo do meio ágar queijo**

O meio ágar queijo (CA) empregado neste estudo foi preparado seguindo a metodologia de Gori et al. (2012), com modificações. Resumidamente, 200 g/L de queijo comercial pasteurizado (queijo Minas padrão) foi homogeneizado com 400 mL de água destilada por 5 min utilizando um liquidificador. A seguir foi adicionando citrato de tri-sódio di-hidratado (12,5 g / L) e a mistura foi aquecida em banho-maria com agitação manual até a dissolução. O volume foi ajustado para 1000 mL e, a seguir, a atividade de água ( $a_w$ ) do meio CA foi ajustada para 0,99; 0,98 e 0,95, pela adição de 51, 130, 195 mL de glicerol (Scharlab SL, Barcelona, Espanha) respectivamente. Os valores de  $a_w$  foram verificados usando o AquaLab CX-2 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA). Foi aferido com pHmetro e confirmado o valor de pH do meio, em torno de 5,5. Subsequentemente, foram adicionados 20 g de ágar (Merck, São Paulo, Brazil), seguido por esterilização a 121 °C por 10 min.

### **2.3 Reativação dos isolados e co-cultivo em ágar queijo**

As suspensões de esporos e de células de levedura foram preparadas de acordo com Das Neves et al. (2021). Resumidamente, a suspensão de células das leveduras, previamente reativadas, foram transferidas para tubos Eppendorf contendo 1 mL de caldo Yeast Extract Peptone Glucose (YEPG) (1% extrato de levedura, 2 % peptona bacteriológica, 2 % glicose) e incubadas a 28 °C por 24 h. Já *A. ochraceus* e *G. candidum* foram cultivados em meio Malt

Yeast Extract Agar (MEA) (extrato de malte, 20 g/L; peptona bacteriológica, 1 g/L e glicose, 20 g/L e ágar, 15 g/L) e incubado por 7 dias a 25 °C. Posteriormente, foi adicionando 10 mL de água destilada estéril contendo Tween 80 a 0,1 % e, em seguida, filtrado através de gaze estéril. A concentração final de esporos e de células foi padronizada para 10<sup>6</sup> esporos ou células/mL, utilizando a câmara de Neubauer.

Os ensaios antagonísticos de co-cultivo, foram realizados de acordo com as metodologias de Decker et al. (2005) e Núñez et al. (2015), com modificações. Resumidamente, cem microlitros da suspensão de células de cada fungo antagonista (10<sup>6</sup> células/mL) foram espalhados na superfície da placa contendo o meio CA em diferentes a<sub>w</sub> (0,98; 0,99 e 0,95 a<sub>w</sub>). Após a secagem, foram inoculados no centro da placa de Petri 10 µL da suspensão de esporos de *A. ochraceus* (10<sup>6</sup> esporos/ mL). No ensaio controle (sem fungo antagonista), apenas 10 µL da suspensão de esporos de *A. ochraceus* (10<sup>6</sup> esporos/ mL) foram inoculados centralmente. As placas foram incubadas, por 12 dias, em triplicata, nas condições de a<sub>w</sub> e temperatura específicas (0,98 a<sub>w</sub> e 18 °C, 0,99 a<sub>w</sub> e 25 °C, 0,95 a<sub>w</sub> e 25 °C). As condições foram escolhidas levando em consideração o crescimento ótimo e alto risco de produção de OTA (ORI) por *A. ochraceus* (URMICRO 11727), conforme mostrado no Artigo 1.

#### 2.4 Avaliação da inibição do crescimento de *A. ochraceus* e quantificação de OTA

O diâmetro da colônia de *A. ochraceus* nos ensaios de controle e co-cultivo foram mensurados com o auxílio de um paquímetro em 2 direções perpendiculares a cada 48 horas ao longo de 12 dias. Os diâmetros (mm) foram plotados contra o tempo (dias), e a taxa de crescimento das colônias foi determinado a partir da inclinação da curva de crescimento, estimado por regressão linear (GIL-SERNA et al., 2014; CASQUETE et al., 2018).

A porcentagem de inibição da taxa de crescimento foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{taxa de crescimento (controle)} - \text{taxa de crescimento (cocultivo)}}{\text{taxa de crescimento (controle)}} * 100 \quad (1)$$

A OTA foi extraída e analisada de acordo com Passamani et al. (2014). Resumidamente, três plugs foram removidos do centro, meio e borda de cada colônia no 12º dia de crescimento no meio CA e colocados em tubos de ensaio com tampa e, em seguida, 1 mL de metanol puro foi adicionado. Os tubos foram homogeneizados vigorosamente por 5 segundos e mantidos, a 25 °C, por 60 minutos. Os extratos foram filtrados em membranas de politetrafluoretileno (0,22 µm; Millipore Corp., Billerica, MA) e analisado em um sistema de HPLC equipado com

um detector de fluorescência RF-10 AXL ( $\lambda_{exc}$  330 nm;  $\lambda_{em}$  460 nm). A coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 250 mm, 5  $\mu$ m) foi usada.

A concentração de OTA nas amostras foi determinada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear, correlacionando a área do pico versus a concentração da respectiva solução padrão.

## 2.5 Cálculo do índice de risco ORI

Os resultados da produção de OTA do controle e co-cultivo foram avaliados em relação ao índice de risco (ORI) proposto por Gil-Serna et al. (2014), que relaciona o crescimento do fungo com a produção de OTA *in vitro* ao final do experimento (12 dias de incubação). O ORI foi calculado a partir da Equação 2:

$$ORI = \log [concentração\ OTA\ (\mu g / mm^2) \times superfície\ da\ colônia\ (mm^2) + 1] \quad (2)$$

O percentual de redução de ORI foi calculado considerando o ORI do ensaio controle como 100% de acordo com a Equação 3:

$$\% \text{ inibição} = \frac{ORI(\text{controle}) - ORI(\text{cocultivo})}{ORI(\text{controle})} * 100 \quad (3)$$

## 2.6 Avaliação dos mecanismos de controle por fungos autóctones em *A. ochraceus*

Foram realizados testes com as seis espécies antagonistas a fim de determinar o possível mecanismo de ação envolvido no controle de *A. ochraceus*.

### 2.6.1 Ensaio de inibição radial

A capacidade antagonista das seis espécies fúngicas para inibir *A. ochraceus* foi avaliada pelo ensaio de inibição radial em placa, de acordo com Sipiczki (2016) e Ruiz-Moyano et al. (2016), com algumas modificações.

Duzentos microlitros de uma suspensão de esporos de *A. ochraceus* ( $10^6$  esporos/mL) foram espalhados na superfície da placa contendo o meio CA em diferentes  $a_w$  (0,98; 0,99 e 0,95  $a_w$ ). Após a secagem, foram inoculados 10  $\mu$ L da suspensão de células de cada fungo antagonista ( $10^6$  células/mL) em discos de papel filtro localizados em pontos equidistantes da placa de Petri. Como controle positivo foi utilizado o antifúngico tebuconazol e como controle

negativo foi inoculado 10 µL de meio YEPG estéril. As placas foram incubadas por 12 dias, em triplicata, nas condições de  $a_w$  e temperatura específicas (0,98  $a_w$  e 18 °C, 0,99  $a_w$  e 25 °C, 0,95  $a_w$  e 25 °C). As placas foram avaliadas quanto a presença ou ausência de halo de inibição ao redor das colônias.

### 2.6.2 Efeito antifúngico de Compostos orgânicos voláteis (COVs)

As seis espécies fúngicas foram avaliadas quanto à produção de COVs antifúngicos, de acordo com De Souza et al., (2021b) e Medina-Córdova et al. (2016), com algumas modificações.

Os fungos antagonistas foram cultivados simultaneamente com *A. ochraceus* em placas bipartidas contendo o meio CA em diferentes  $a_w$  (0,98; 0,99 e 0,95  $a_w$ ). De um lado da placa, foi feito o espalhamento de uma alíquota de 50 µL de suspensão de células dos fungos antagonistas ( $10^6$  células/mL) utilizando alça de Drigalski e do outro lado, uma foi inoculado centralmente 5 µL da suspensão de esporos de *A. ochraceus* ( $10^6$  esporos/mL). O controle consistiu na placa inoculada apenas com *A. ochraceus*. As placas foram seladas e incubadas por 12 dias, em triplicata, nas condições de  $a_w$  e temperatura específicas (0,98  $a_w$  e 18 °C, 0,99  $a_w$  e 25 °C, 0,95  $a_w$  e 25 °C). A atividade inibitória (IA) foi calculada segundo Medina-Córdova et al. (2016) através da Equação (4):

$$\% IA = \frac{\text{diâmetro da colônia (controle)} - \text{diâmetro da colônia (cocultivo)}}{\text{diâmetro da colônia (controle)}} * 100 \quad (4)$$

### 2.7 Identificação de COVs por GC-MS

Para determinar o perfil de COVs produzidos pelas espécies antagonistas, tubos de 50 mL foram preparados contendo 20 mL de meio CA com 0,98  $a_w$ . A condição do meio CA foi selecionada com base na alta porcentagem de inibição por COVs e por apresentar  $a_w$  semelhante a condição inicial na maturação do QMA (DORES et al., 2013; MARTINS et al., 2015). Foram inoculados 100 µL da suspensão de células ( $10^6$  células/ mL) dos fungos antagonistas, e como tratamento controle foi utilizado o meio de cultivo CA (0,98  $a_w$ ) não inoculado. A análise do meio CA realizada nas mesmas condições para excluir qualquer interferência causada por compostos voláteis do meio de cultivo. Os tubos foram incubados por 12 dias à 18 °C, sob agitação à 60 G, com duas repetições.

A composição de COVs dos fungos autóctones foi avaliada qualitativamente por microextração em fase sólida (HS-SPME) seguida de cromatografia gasosa acoplada à análise de espectrometria de massa (GC-MS). A análise foi realizada seguindo a metodologia desenvolvida e testada especificamente para queijos curados pela Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) da Universidade Federal de Lavras.

A extração dos COVs foi realizada empregando a fibra de dinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30  $\mu\text{m}$ ) para a partição dos compostos voláteis presentes na amostra. As amostras foram incubadas a 60 °C por 10 min e a seguir extraídas com exposição da fibra ao headspace, por 30 minutos. Após a extração, a fibra foi inserida no injetor do cromatógrafo gasoso (SHIMADZU211 CG/MS-QP2010), no qual os compostos voláteis foram desorvidos, a 250 °C, por 5 minutos, no modo Splitless.

A identificação dos compostos foi realizada no equipamento (SHIMADZU211 CG/MS-QP2010) sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida Silb-5MS (Supelco, 30 m  $\times$  0,25 mm e 0,25  $\mu\text{m}$ ) com temperatura inicial do forno aumentada para 40 °C para 10 min, e então ajustado para 230 °C, a uma taxa de 5 °C/min, com um tempo total de execução de 53 minutos. O gás hélio foi usado como gás de arraste com uma vazão de 2,0 mL/min. E taxa de Split (partição da amostra) 1:10. Os compostos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST (GC-MS Solution Library, 2020).

## **2.8 Análise estatística**

Os experimentos foram conduzidos empregando uma espécie toxigênica ( $10^6$  esporos/mL) na presença de seis espécies antagonistas ( $10^6$  esporos/mL) cultivado em três condições diferentes, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade utilizando o *software* Sisvar 5.6 (FERREIRA et al., 2014).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Efeito dos fungos autóctones no crescimento e risco ORI de *A. ochraceus***

O efeito antagonístico dos fungos autóctones na taxa de crescimento e risco ORI, foram avaliados sob condições em que houve produção de OTA e de maior risco ORI, para *A.*

*ochraceus* no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) observado no Artigo 1. As taxas de crescimento e ORI dos controles, do presente estudo, são apresentados na Tabela 1.

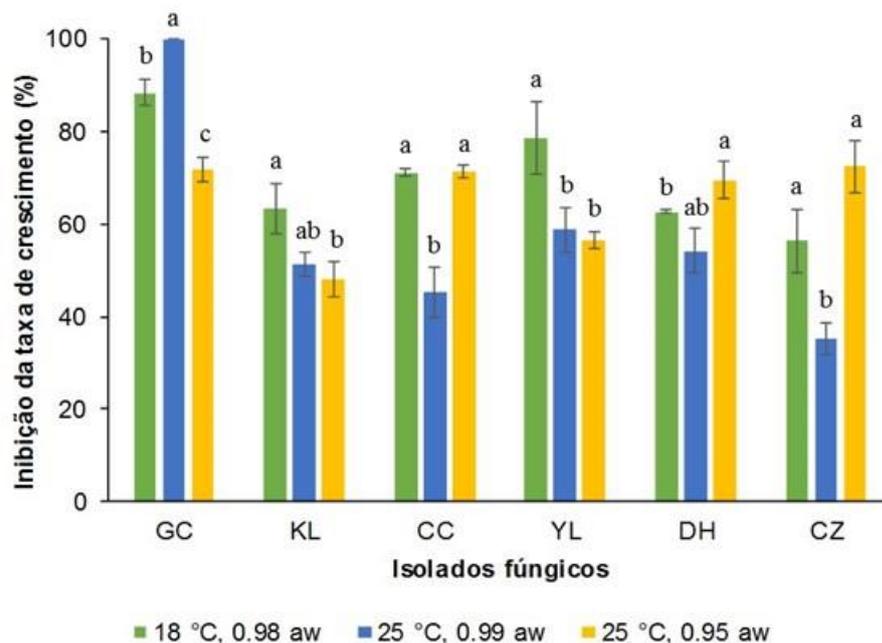
**Tabela 1.** Taxa de crescimento de *A. ochraceus* URMICRO 11727 e seu respectivo índice de risco OTA (ORI), em meio sintético de queijo.

Condições	Taxa de crescimento (mm/ dia)	ORI
0,98 / 18 °C	4,68 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,68 ± 0,05 <sup>b</sup>
0,99 / 25 °C	5,13 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,20 ± 0,10 <sup>a</sup>
0,95 / 25 °C	6,13 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,03 <sup>ab</sup>

<sup>a-c</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam as diferenças estatísticas a 5 % de probabilidade no teste de Tukey. Fonte: Do autor (2023).

A porcentagem de inibição da taxa de crescimento de *A. ochraceus* é mostrada na Fig. 1. Todas as espécies apresentaram uma inibição superior a 35 %, variando o nível de inibição de acordo com a condição empregada.

**Figura 1.** Efeito dos fungos autóctones como agentes antagonistas na taxa de crescimento de *A. ochraceus* URMICRO 11727, sob diferentes condições de  $a_w$  e temperatura. **GC:** *G. candidum* URMICRO 11726; **KL:** *K. lactis* URMICRO 2068; **CC:** *C. catenulata* URMICRO 2069; **YL:** *Y. lipolytica* URMICRO 2062; **DH:** *D. hansenii* URMICRO 2060; **CZ:** *C. zeylanoides* URMICRO 2061. Os dados são ilustrados como a média de três repetições de cada tratamento e o desvio padrão correspondente (linha vertical). Letras diferentes indicam as diferenças estatísticas a 5 % de probabilidade no teste de Tukey.

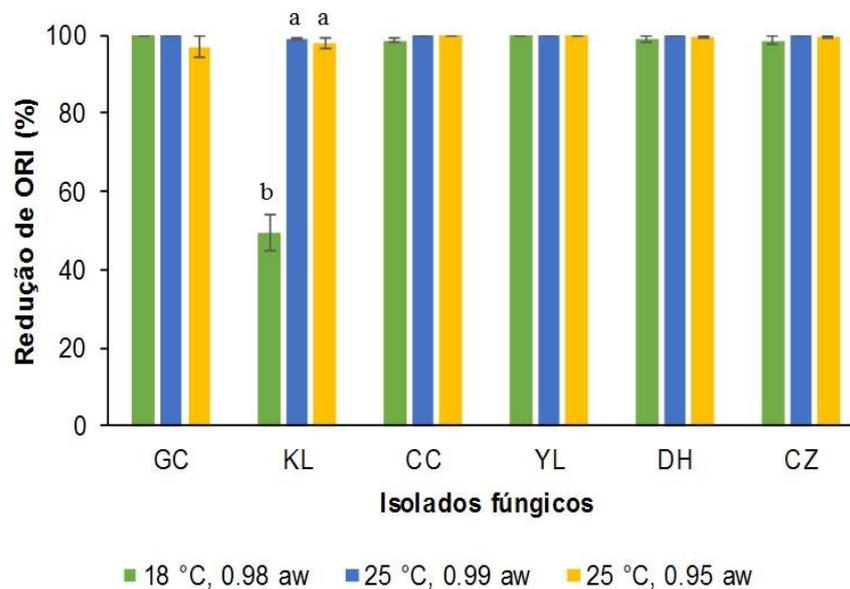


Fonte: Do autor (2023).

As maiores taxas de inibição foram encontradas empregando *G. candidum* como espécie antagonista, proporcionando 88,37 % e 100 % de redução nas condições 0,98 / 18 °C e 0,99 / 25 °C, respectivamente.

A porcentagem de redução do risco de contaminação (ORI) de *A. ochraceus* é mostrada na Fig. 2. O risco de contaminação não foi observado em nenhuma das condições testadas empregando *Y. lipolytica*. Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) para ORI entre as condições avaliadas, utilizando *C. catenulata*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii*, *C. zeylanoides* e *G. candidum* como espécies antagonistas. A exceção foi *K. lactis*, que exibiu o maior risco de contaminação (0,849) na condição 0,98/18 °C.

**Figura 2.** Efeito dos fungos autóctones para a redução de ORI de *A. ochraceus* URMICRO 11727, sob diferentes condições de  $a_w$  e temperatura. **GC:** *G. candidum* URMICRO 11726; **KL:** *K. lactis* URMICRO 2068; **CC:** *C. catenulata* URMICRO 2069; **YL:** *Y. lipolytica* URMICRO 2062; **DH:** *D. hansenii* URMICRO 2060; **CZ:** *C. zeylanoides* URMICRO 2061. Os dados são ilustrados como a média de três repetições de cada tratamento e o desvio padrão correspondente (linha vertical). Letras diferentes indicam as diferenças estatísticas a 5 % de probabilidade no teste de Tukey.



Fonte: Do autor (2023).

### 3.2 Efeito antifúngico de compostos produzidos por fungos autóctones no crescimento de *A. ochraceus*

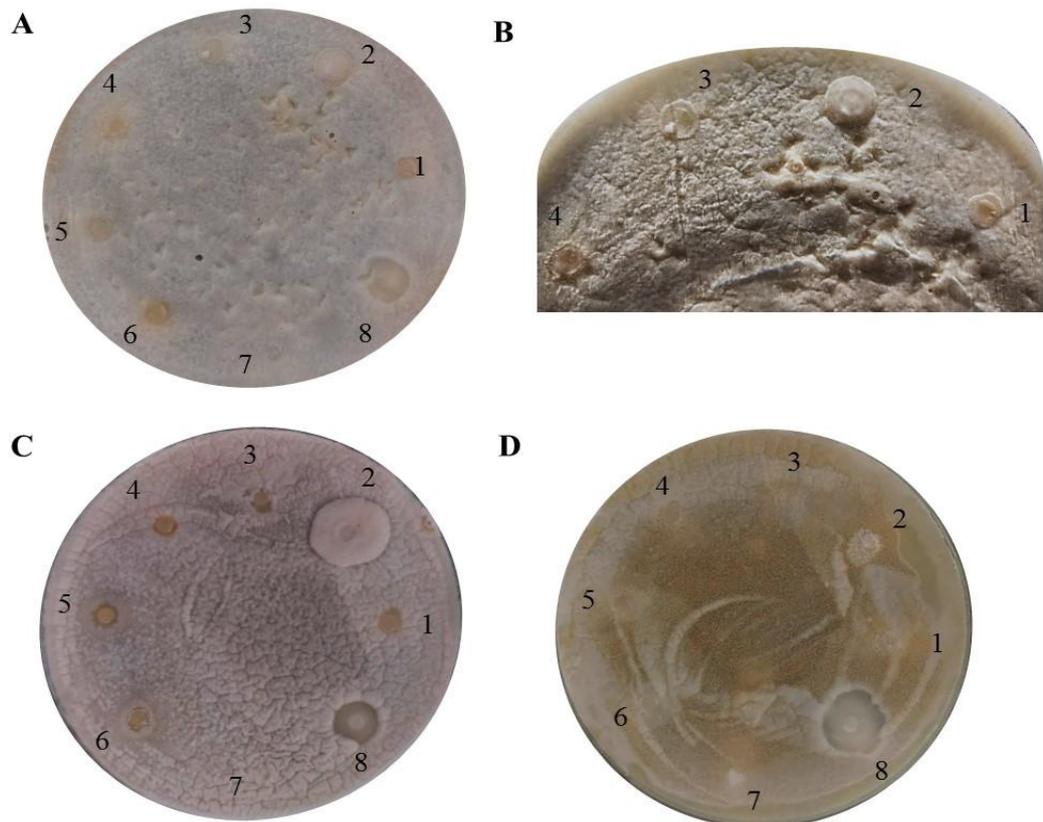
Para elucidar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antagônica baseada na produção de compostos extracelulares, o efeito dos fungos autóctones foi avaliado quanto a

produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) e quanto a capacidade de produzir compostos solúveis inibitórios.

### 3.2.1 Ensaio de inibição radial

Os ensaios de inibição radial revelaram que as espécies testadas não produzem metabólitos antifúngicos solúveis em meio sintético de queijo capaz de inibir *A. ochraceus* (Fig. 3), por não apresentar halo de inibição ao redor das colônias em todas as condições testadas. Tais resultados sugerem que a inibição de crescimento de *A. ochraceus* ocorre por outros mecanismos, como competição por espaço e nutrientes, e/ ou por atividade antifúngica de compostos orgânicos voláteis.

**Figura 3.** Efeito antagonista dos fungos autóctones sobre o crescimento de *A. ochraceus* URMICRO 11727, após 12 dias de incubação em meio à base de queijo à 0,98  $a_w$  e 18 °C (**Fig. 3.A e 3.B**); 0,99  $a_w$  e 25 °C (**Fig. 3.C**); 0,95  $a_w$  e 25 °C (**Fig. 3.D**). Co-cultivo foi realizado com 6 espécies bioprotetoras, identificadas por: 1 (*C. zeylanoides* URMICRO 2061), 2 (*G. candidum* URMICRO 11726), 3 (*D. hansenii* URMICRO 2060), 4 (*Y. lipolytica* URMICRO 2062), 5 (*C. catenulata* URMICRO 2069), 6 (*K. lactis* URMICRO 2068). Controle negativo: 7 (meio de cultura YEPG estéril) e Controle positivo: 8 (Tebuconazol).

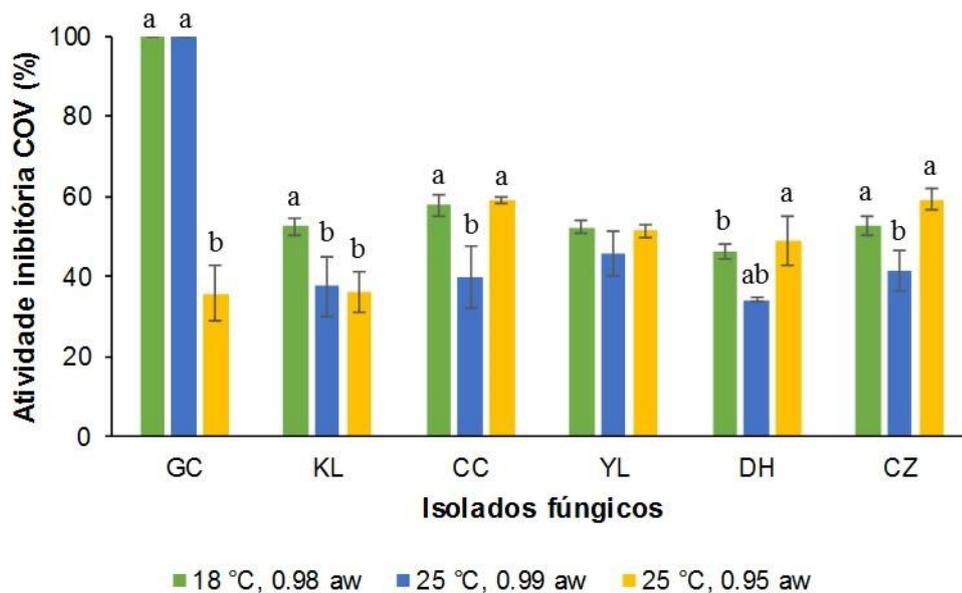


Fonte: Do autor (2023).

### 3.2.2 Avaliação do efeito antifúngico de COVs

Os COVs produzidos pelas seis espécies de fungos autóctones limitaram o crescimento de *A. ochraceus*, exibindo diferentes graus de inibição dependendo da condição de cultivo, conforme mostrado na Fig. 4. O diâmetro da colônia de *A. ochraceus* (controle) com 12 dias de incubação nas diferentes condições foi de 28,98 mm (0,98  $a_w$  e 18 °C), 35,66 mm (0,95  $a_w$  e 25°C) e 27,04 mm (0,99  $a_w$  e 25 °C).

**Figura 4.** Efeito de COVs antifúngicos produzidos pelos fungos autóctones no crescimento de *A. ochraceus* URMICRO 11727, sob diferentes condições de  $a_w$  e temperatura. **GC:** *G. candidum* URMICRO 11726; **KL:** *K. lactis* URMICRO 2068; **CC:** *C. catenulata* URMICRO 2069; **YL:** *Y. lipolytica* URMICRO 2062; **DH:** *D. hansenii* URMICRO 2060; **CZ:** *C. zeylanoides* URMICRO 2061. Os dados são ilustrados como a média de três repetições de cada tratamento e o desvio padrão correspondente (linha vertical). Letras diferentes indicam as diferenças estatísticas a 5 % de probabilidade no teste de Tukey.



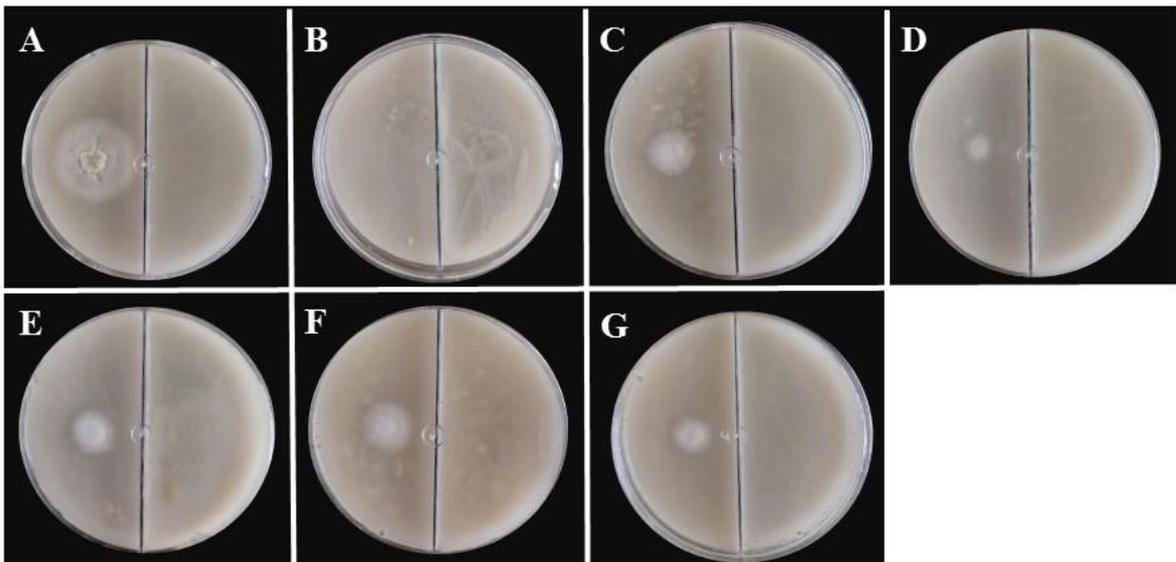
Fonte: Do autor (2023).

Entre as espécies testadas, *G. candidum* foi a única que demonstrou efeito fungicida, proporcionando 100 % de inibição nas condições 0,98 / 18 °C e 0,99 / 25 °C. A redução do crescimento de *A. ochraceus* foi consequência da atividade fungistática dos COVs produzidos por *K. lactis*, *C. catenulata*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii* e *C. zeylanoides*. A inibição de *A. ochraceus* por *Y. lipolytica* variou de 58,35% a 60,67%, sem apresentar diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ).

A morfologia das colônias foi observada diariamente, e constatou-se a redução da esporulação de *A. ochraceus*, possivelmente pela emissão de COVs produzidos pelas espécies

autóctones durante a metabolização do meio de cultura CA, principalmente na condição 0,98  $a_w$  e 18 °C, conforme mostrado pela Fig. 5.

**Figura 5.** Antagonismo *in vitro* de *A. ochraceus* (URMICRO 11727) por COVs produzidos por espécies fúngicas autóctones em meio sintético de queijo após 12 dias de incubação na condição 0,98  $a_w$  e 18°C. **Controle:** *A. ochraceus* (A). **Biocontrole:** *G. candidum* e *A. ochraceus* (B); *K. lactis* e *A. ochraceus* (C); *C. catenulata* e *A. ochraceus* (D); *Y. lipolytica* e *A. ochraceus* (E); *D. hansenii* e *A. ochraceus* (F); *C. zeylanoides* e *A. ochraceus* (G).



Fonte: Do autor (2023).

### 3.3 Identificação dos COVs

A análise HS-SPME/GC-MS permitiu identificar cerca de doze COVs, pertencentes a diferentes classes químicas, como álcoois, aldeído e éster. A Tabela 2 representa os compostos produzidos para cada uma das espécies antagônicas (*G. candidum*, *K. lactis*, *C. catenulata*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii* e *C. zeylanoides*), excluindo os compostos detectados no headspace controle. Dentre os compostos, três álcoois (2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e 2-feniletanol) com propriedades antifúngicas já relatadas, foram produzidos em maior frequência entre as espécies. O 3-metil-1-butanol foi o único composto produzido por todas as espécies avaliadas.

**Tabela 2.** Compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por fungos autóctones antagonistas durante a incubação em meio CA à 18 °C por 12 dias.

No.	Compostos voláteis	IR	Ensaio*					
			GC	KL	CZ	YL	DH	CC
1	3-Metil-butanal <sup>ald</sup>	Nd	x			x		
2	2-Metil-1-butanal <sup>ald</sup>	Nd	x				x	
3	3-Metil-1-butanol <sup>alc</sup>	Nd	x	x	x	x	x	x
4	2-Metil-1-butanol <sup>alc</sup>	Nd	x	x	x			x
5	2-Heptanol <sup>alc</sup>	930		x	x			x
6	Feniletanal <sup>ald</sup>	1065	x			x		
7	2-Metilpentil isobutirato <sup>es</sup>	1079	x					
8	2-Nonanol <sup>alc</sup>	1111	x		x			x
9	2-feniletanol <sup>alc</sup>	1123	x	x		x	x	x
10	Acetado de 2-feniletila <sup>es</sup>	1259		x				
11	2-Dodecanol <sup>alc</sup>	1305	x		x			
12	Propionato de 2-feniletila <sup>es</sup>	1354		x				

*IR* índice de retenção linear estimado; *alc* álcool; *ald* aldeído; *es* éster.

*nd* IR inferior ao hidrocarboneto de classificação mais baixa.

\* Resultado representado em presença (x) ou ausência do composto.

Fonte: Do autor (2023).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, as espécies fúngicas *G. candidum*, *D. hansenii*, *K. lactis*, *Y. lipolytica*, *C. catenulata* e *C. zeylanoides*, previamente isoladas do QMA (ARAGÃO et al., 2022; DE SOUZA et al., 2021) foram testadas *in vitro* por sua importância na qualidade do queijo atrelada ao potencial antagonístico contra *A. ochraceus* e redução do risco de produção de OTA (ORI). Este é o primeiro relato da capacidade dessas espécies autóctones em reduzir a taxa de crescimento de *A. ochraceus* no co-cultivo em meio sintético de queijo. A descoberta foi consistente com estudos anteriores, que indicam a eficiência antagonística dessas espécies contra fungos contaminantes e/ ou micotoxigênicos, em diferentes substratos e condições (DECKER et al., 2005; GHANBARI et al., 2019; MEDINA-CÓRDOVA et al., 2016; MEDINA-CÓRDOVA et al., 2018; MOOKHERJEE et al., 2018; NIELSEN et al., 1998; NÚÑEZ et al., 2015; PEREZ et al., 2017; VIRGILI et al., 2012; YANG et al., 2016).

É sabido que o efeito antagonístico de leveduras bioprotetoras é baseado na sinergia de diferentes mecanismos de ação, incluindo a competição por nutrientes e espaço, antagonismo

pela produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, toxinas assassinas e ainda compostos orgânicos voláteis (YANG et al., 2022; NÚÑEZ et al., 2015). Além disso, neste trabalho observamos que fatores abióticos, como  $a_w$  e temperatura influenciaram na eficiência inibitória dos agentes de biocontrole no co-cultivo. Estes resultados concordam com os obtidos por Das Neves et al. (2021) que verificaram que a temperatura e  $a_w$  afetaram a eficiência do controle biológico exercido por *Saccharomyces cerevisiae* contra espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicas, em contrapartida, para *A. ochraceus* houve uma alta redução de ORI independente da condição avaliada. De forma semelhante, neste estudo, poucas diferenças foram observadas na redução de ORI entre as diferentes condições, exceto para *K. lactis* à 0,98  $a_w$  e 18 °C. No geral, as espécies antagonicas demonstraram eficiência na redução e /ou inibição dos níveis de OTA, mesmo em condições que permitiram o desenvolvimento de *A. ochraceus*. Portanto, os resultados sugerem que o crescimento de *A. ochraceus* não implica na produção de OTA, quando biocontrolado.

Vários estudos com biocontrole de fungos micotoxigênicos relataram a ação de diferentes mecanismos na redução do acúmulo de OTA. A regulação negativa de genes relacionados à biossíntese de OTA já foi relatada em trabalhos empregando *D. hansenii* (GIL-SERNA et al., 2011; PEROMINGO et al., 2018). Além disso, esse mecanismo também está envolvido na redução de OTA pela ação de diferentes gêneros, como *Saccharomyces*; *Cyberlindnera*; *Candida* e *Lachancea* (DAS NEVES et al., 2021; FARBO et al., 2018). A adsorção de OTA à parede de leveduras como *D. hansenii* (GIL-SERNA et al., 2011); *Candida intermedia*, *Lachancea thermotolerans* e *Candida fritorichii* (FIORI et al., 2014), também atuam na remoção de OTA extracelular. A OTA pode ainda ser eliminada pela degradação por enzimas constitutivas. De acordo com Zhang et al. (2018), *Y. lipolytica* é capaz de degradar OTA à OTA $\alpha$  pela atividade de carboxipeptidases. Nesse sentido, diferentes mecanismos podem ser responsáveis pela redução de OTA pelos agentes antagonistas avaliados neste estudo. Compreender qual a via responsável pela remoção de OTA em meio sintético de queijo, será objetivo de um estudo diferente.

Os testes de interação por co-cultivo revelaram que aos 25 °C e 0,99  $a_w$ , *G. candidum* exibiu um ótimo crescimento, exercendo excelente competição por nutrientes e espaço que resultou na inibição total de *A. ochraceus*. De forma semelhante, outros autores atribuíram a competição por nutrientes e espaço como mecanismo de inibição exercido por *G. candidum* contra espécies de *Penicillium* contaminantes em queijos (DECKER et al., 2005; NIELSEN et al., 1998) e na inibição de *Mucor* e *Penicillium* tanto em meio YEA quanto na superfície de

queijo bryndza esterilizado (SIPICZKI et al., 2023). De fato, a baixa  $a_w$  avaliada neste estudo parece afetar a competitividade de *G. candidum*, supostamente por limitar seu desenvolvimento. Koňuchová et al. (2021), observou que a condição ideal para o crescimento de *G. candidum* é em torno de 0,99  $a_w$ , entre 25 à 28°C, e um crescimento mínimo é relatado entre 0,948 à 0,960  $a_w$ .

De acordo com a literatura, *G. candidum* é detectado no leite cru (BOUTROU et al., 2005; DELAVENNE et al., 2011), bem como as espécies *K. lactis*, *D. hansenii*, *C. catenulata*, *C. zeylanoides*, *Y. lipolytica* (CORBO et al., 2001; DELAVENNE et al., 2011), consequentemente essas espécies podem colonizar a superfície dos queijos artesanais durante os estágios iniciais da maturação. De fato, Cardoso et al. (2015), observou a presença de *D. hansenii* e *C. catenulata* em QMA produzido na região do Serro com 3 dias de maturação dependendo da estação (seca ou chuvosa), enquanto Borelli et al., (2006) relatou a presença de *C. catenulata*, *D. hansenii* e *K. lactis* em QMA da região da Serra da Canastra, com 5 dias de maturação. Marcellino et al. (2014) associa a presença de *G. candidum* aos estágios iniciais da maturação de queijos franceses como Camembert, Saint-Nectaire e Reblochon. Em QMA produzido na região de Araxá, Cesario et al. (Resultados não publicados), observou abundância de *G. candidum* em queijos a partir de 15 dias de maturação e *K. lactis* a partir das amostras com 0 dias de maturação. Tendo em vista que o QMA apresenta 0,98  $a_w$  até 8 dias de maturação (DORES et al., 2013; MARTINS et al., 2015), a prevalência dessas espécies nos estágios iniciais é de grande importância na segurança do QMA por reduzir o risco de contaminação, particularmente por *A. ochraceus*.

Todas as espécies avaliadas no presente estudo demonstraram inibição por contato pela competição, entretanto não apresentaram uma zona de inibição ao redor das colônias, sugerindo que em meio de queijo é bastante improvável que os fungos secretem metabólitos antifúngicos solúveis (RUIZ-MOYANO et al., 2016). Em contrapartida, *A. ochraceus* apresentou redução micelial e na esporulação pela ação de COVs produzidos por *K. lactis*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii*, *C. catenulata* e *C. zeylanoides*, com diferentes efeitos fungicidas de acordo com a condição de cultivo. *G. candidum* foi a única espécie que exerceu efeito fungicida pela produção de COVs em  $a_w$  de 0,98 e 0,99 e temperatura de 18 °C e 25 °C, respectivamente. Estes resultados colaboram com resultados de outros trabalhos que observaram a inibição fungica associada a produção de metabólitos voláteis por *G. candidum* (MOOKHERJEE et al., 2018; TARIQ et al., 1991), *D. hansenii* (HUANG et al., 2021; MEDINA-CÓRDOVA et al., 2016), *K. lactis* (TACZMAN-BRÜCKNER et al., 2005) e *Y. lipolytica* (DELALI et al., 2021). Até o momento

não há relatos na literatura sobre a atividade antagonista de *C. catenulata* e *C. zeylanoides* contra fungos deteriorantes e/ ou micotoxigênicos estar ligado ao mecanismo de inibição por COVs antifúngicos. Embora alguns trabalhos relatem o potencial de *C. catenulata* e *C. zeylanoides* como agentes de biocontrole, não investigaram este mecanismo de ação (PEREZ et al., 2017; VIRGILiet al., 2012).

A emissão de COVs é um importante mecanismo antifúngico predominante em microrganismos antagonistas. Os COVs podem desencadear alterações morfológicas nas hifas, além de danificar a parede celular e a membrana fúngica pela peroxidação lipídica, que aumenta a permeabilidade e resulta conseqüentemente no extravasamento celular (ZHAO et al., 2022). Recentemente, Mitra et al. (2023) demonstrou que COVs produzidos por *G. candidum*, restringiram o desenvolvimento de *Rhizoctonia solani* e *Curvularia oryzae*, provocando alterações morfológicas e efeito fungicida pelo aumento do estresse oxidativo que foi mensurado pelo alto índice de malondialdeído (produto da peroxidação lipídica). Ressalta-se que a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) fazem parte do metabolismo aeróbico natural do fungo, entretanto, o aumento ocorre em condições de estresse causado por diferentes fatores biótico ou abióticos. Portanto, o estresse oxidativo é induzido quando a produção de ROS intracelular é superior ao mecanismo de defesa antioxidante natural da célula (MITRA et al., 2023).

A análise de GC-MS permitiu identificar vários compostos produzidos pelas espécies antagonistas durante a metabolização do meio de queijo. O perfil metabólico exerce papel importante na atribuição de sabor e aroma, além de conferir proteção contra espécies fúngicas contaminantes e/ ou micotoxigênicas. De fato, no presente estudo detectamos particularmente três compostos prevalentes (2- metil- 1- butanol, 3- metil- 1- butanol e 2- feniletanol) com propriedades antifúngicas já relatada por outros trabalhos (ANDO et al., 2012; DE SOUZA et al., 2021b; FARBO et al, 2018; HUANG et al, 2021; JAIBANGYANG et al., 2020; MASOUD et al., 2005; MOOKHERJEE et al, 2018; REZENDE et al., 2015). O composto 3- metil- 1- butanol (álcool isoamílico) produzido por todas as espécies antagônicas avaliadas no presente estudo, foi anteriormente observado como o principal composto capaz de inibir com efeito fungicida a germinação de esporos de 15 espécies pertencente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Botryotinia* e *Fusarium* (ANDO et al., 2012). É um álcool frequentemente detectado em diferentes queijos artesanais (INNOCENTE et al., 2013; PENLAND et al., 2021; WOLF et al., 2010), e pode conferir notas alcoólicas e florais (MOLIMARD et al., 1996).

Em QMA da Canastra os álcoois 2- metil- 1- butanol e 3- metil-1- butanol fazem parte do perfil aromático do queijo (DE JESUS FILHO et al., 2021). Segundo Nogueira et al. (2005), o 3- metil-1- butanol atribui notas sensoriais importantes para o queijo, bem como 2- metil- 1- butanol conforme relatado por Curioni et al. (2002) está associado a notas alcólicas. Já o álcool fenético (2- feniletanol) é relatado em queijos artesanais de outros países, como o queijo Xinotyri (BONTINIS et al., 2012) e Pélardon (PENLAND et al., 2021). Este álcool é produzido a partir da fenilalanina e atribui um aroma agradável frequentemente associado às notas florais (CURIONI et al., 2002; MOLIMARD et al., 1996). Portanto, pelo fato destes álcoois serem relacionados à boas descrições sensoriais em queijos, inferimos que a presença das espécies autóctones avaliadas neste estudo é importante tanto na segurança como na qualidade sensorial do QMA.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que *G. candidum*, *D. hansenii*, *K. lactis*, *Y. lipolytica*, *C. catenulata* e *C. zeylanoides* reduziram o risco de contaminação por *A. ochraceus*, além de atuar na redução de ORI. O efeito antifúngico é provavelmente relacionado a ação concomitante dos mecanismos de competição por espaço e nutrientes e produção de metabólitos voláteis. Por isso, a presença destas espécies autóctones no QMA confere proteção, sem alterar a tipicidade do produto.

## REFERÊNCIAS

- ANDO, H., et al. Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. **Food Control**, 26(2), 472-478, 2012.
- ANELLI, P., et al. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. **Food microbiology**, 78, 62-72, 2019.
- ARAGÃO, M. O., et al. Fungal community and physicochemical profiles of ripened cheeses from the Canastra of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Food Science and Technology**, 59(12), 4685-4694, 2022.
- ARAÚJO-RODRIGUES, H., et al. A review on microbiological and technological aspects of Serpa PDO cheese: An ovine raw milk cheese. **International Dairy Journal**, 100, 104561, 2020.
- BANJARA, N., SUHR, M. J., & HALLEN-ADAMS, H. E. (2015). Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. **Current microbiology**, 70(6), 792-800, 2015.
- BEMFEITO, R. M., et al. Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**, 99(10), 7886-7897, 2016.
- BIAGIOTTI, C., et al. Occurrence and involvement of yeast biota in ripening of Italian Fossa cheese. **European Food Research and Technology**, 244(11), 1921-1931, 2018.
- BONTINIS, T. G., et al. Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. **Small Ruminant Research**, 105(1-3), 193-201, 2012.
- 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**, 22(11), 1115-1119, 2006.
- BOUTROU, R., & GUÉGUEN, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International Journal of Food Microbiology**, 102(1), 1-20, 2005.
- CAMARDO LEGGIERI, M., PIETRII, A., & BATTILANI, P. Modelling fungal growth, mycotoxin production and release in grana cheese. **Microorganisms**, 8(1), 69, 2020.
- CARDOSO, V. M., et al. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, 69, 331-340, 2015.
- CASQUETE, R., et al. Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. **LWT**, 89, 179-185, 2018.
- CORBO, M. R., et al. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. **International Journal of Food Microbiology**, 69(1-2), 147-152, 2001.
- CURIONI, P. M. G., & BOSSET, J. O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. **International Dairy Journal**, 12(12), 959-984, 2002.

- DAS NEVES, T. T., et al. Simulation of coffee beans contamination by *Aspergillus* species under different environmental conditions and the biocontrol effect by *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT**, 148, 111610, 2021.
- DE JESUS FILHO, M., et al. Key aroma compounds of Canastra cheese: HS-SPME optimization assisted by olfactometry and chemometrics. **Food Research International**, 150, 110788, 2021.
- DE SOUZA, M. L., et al. Yeasts prevent ochratoxin A contamination in coffee by displacing *Aspergillus carbonarius*. *Biological Control*, 155, 104512, 2021b.
- DE SOUZA, T. P., et al. Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. **International Dairy Journal**, 120, 105085, 2021.
- DECKER, M., & NIELSEN, P. V. The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated fungi of white mould cheese. **International Journal of Food Microbiology**, 104(1), 51–60, 2005.
- DECONTARDI, S., et al. Polyphasic identification of *Penicillium* and *Aspergillus* isolated from Italian grana cheese. **Food Microbiology**, 73, 137-149, 2018.
- DELALI, K. I., et al. Evaluation of yeast isolates from kimchi with antagonistic activity against green mold in citrus and elucidating the action mechanisms of three yeast: *P. kudriavzevii*, *K. marxianus*, and *Y. lipolytica*. **Postharvest Biology and Technology**, 176, 111495, 2021.
- DELAVERNE, E., et al. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. **International journal of food microbiology**, 151(2), 247-251, 2011.
- DORES, M. T. D., NOBREGA, J. E. D., & FERREIRA, C. L. D. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology**, 33(1), 180-185, 2013.
- EM- Estado de Minas. (2017). Queijo mineiro é premiado na França. [https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2017/06/14/internas\\_economia,876364/queijo-mineiro-e-premiado-na-franca.shtml](https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2017/06/14/internas_economia,876364/queijo-mineiro-e-premiado-na-franca.shtml). (Accessed 2 July 2020).
- FADDA, M., et al. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. **International Journal of Food Microbiology**, 95(1), 51–59, 2004.
- FARBO, M. G, et al. Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, 284, 1-10, 2018,
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, 38, 109-112, 2014.
- FIEMG - Federação das Indústrias do Estado de Minas Gerais. (2019). Queijos mineiros são premiados em concurso na França. <https://www7.fiemg.com.br/noticias/detalhe/queijos-mineiros-sao-premiados-em-concurso-na-franca>. (Accessed 15 July 2020).

FIORI, S., et al. Biocontrol activity of four non-and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. **International journal of food microbiology**, 189, 45-50, 2014.

G1- Globo. (2021) Queijo brasileiro fica em segundo lugar em quantidade de medalhas em concurso mundial da França.  
<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2021/09/14/queijo-brasileiro-fica-em-segundo-lugar-em-quantidade-de-medalhas-em-concurso-mundial-da-franca.ghml>. (Accessed 10 July 2023).

GHANBARI, R., et al. Biocontrol effect of *Kluyveromyces lactis* on aflatoxin expression and production in *Aspergillus parasiticus*. **FEMS microbiology letters**, 366(10), fnz114, 2019.

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**, 151(1), 113-118, 2011.

GIL-SERNA, J., et al. Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. **Food research international**, 61, 127-131, 2014.

GORI, K., et al. *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. **Microbiology Open**, 1, 16–168, 2012.

HUANG, C., et al. *Debaryomyces hansenii* strains isolated from Danish cheese brines act as biocontrol agents to inhibit germination and growth of contaminating molds. **Frontiers in Microbiology**, 12, 662785, 2021.

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

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 2051, de 07 de abril de 2021**. Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 07 de abril de 2021.

INNOCENTE, N., MUNARI, M., & BIASUTTI, M. Characterization by solid-phase microextraction-gas chromatography of the volatile profile of protected designation of origin Montasio cheese during ripening. **Journal of dairy science**, 96(1), 26-32, 2013.

JAIBANGYANG, S., NASANIT, R., & LIMTONG, S. Biological control of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* by volatile organic compound-producing antagonistic yeasts. **BioControl**, 65, 377-386, 2020.

KANDASAMY, Sujatha et al. Characterisation of fungal contamination sources for use in quality management of cheese production farms in Korea. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 33, n. 6, p. 1002, 2020.

KONUCHOVÁ, M., & VALÍK, L. Modelling the radial growth of *Geotrichum candidum*: Effects of temperature and water activity. **Microorganisms**, 9(3), 532, 2021.

KURE, C. F., et al. Mould contaminants on Jarlsberg and Norvegia cheese blocks from four factories. **International Journal of Food Microbiology**, 70(1-2), 21-27, 2001.

- LEGGIERI, C. M., PIETRI, A., & BATTILANI, P. Modelling fungal growth, mycotoxin production and release in grana cheese. **Microorganisms**, 8(1), 69, 2020.
- LOPANDIC, K., et al. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, 23(4), 341–350, 2006.
- MARCELLINO, N., & BENSON, D. R. The good, the bad, and the ugly: Tales of mold-ripened cheese. **Cheese and Microbes**, 95-131, 2014.
- MARTINS, J. M., et al. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, 46, 219-230, 2015.
- MASOUD, W., POLL, L., & JAKOBSEN, M. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **Yeast**, 22(14), 1133-1142, 2005.
- MEDINA-CÓRDOVA, N., et al. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). **Biological Control**, 97, 70-79, 2016.
- MEDINA-CÓRDOVA, N., et al. The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. **Biological Control**, 121, 216–222, 2018.
- MITRA, M., et al. Fruity-scented antifungal volatiles from endophytic *Geotrichum candidum* PF005: broad-spectrum bioactivity against stored grain pathogens, mode of action and suitable formulation for mycofumigation. **Biological Control**, 177, 105129, 2023.
- MOLIMARD, P., & SPINNLER, H. E. Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. **Journal of dairy science**, 79(2), 169-184, 1996.
- MOOKHERJEE, A., et al. Characterization and synergistic effect of antifungal volatile organic compounds emitted by the *Geotrichum candidum* PF005, an endophytic fungus from the eggplant. **Microbial ecology**, 75(3), 647-661, 2018.
- NAZ, S., et al. Aromatic amino acids as precursors of antimicrobial metabolites in *Geotrichum candidum*. **FEMS microbiology letters**, 344(1), 39-47, 2013.
- NIELSEN, M. S., FRISVAD, J. C., & NIELSEN, P. V. (1998). Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. **International journal of food microbiology**, 42(1-2), 91-99, 1998.
- NOGUEIRA, M. C. L., LUBACHEVSKY, G., & RANKIN, S. A. A study of the volatile composition of Minas cheese. **LWT-Food Science and Technology**, 38(5), 555-563, 2005.
- NÚÑEZ, F., et al. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic *penicillia* in dry-fermented sausages. **Food Microbiology**, 46, 114–120, 2015.
- PADILLA, B., et al. Potential impact of dairy yeasts on the typical flavour of traditional ewes' and goats' cheeses. **International Dairy Journal**, 35(2), 122-129, 2014.

- PASSAMANI, F. R. F., et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin a by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. **Journal of Food Protection**, 77(11), 1947–1952, 2014.
- PENLAND, M., et al. Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, 345, 109130, 2021.
- PEREZ, M. F., et al. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. **Biological Control**, 115, 135-140, 2017.
- PEROMINGO, B., et al. Potential of yeasts isolated from dry-cured ham to control ochratoxin A production in meat models. *International journal of food microbiology*, 268, 73-80, 2018.
- RAMOS-PEREIRA, J., et al. Polyphasic identification of *Penicillium spp.* isolated from Spanish semi-hard ripened cheeses. **Food Microbiology**, 84, 103253, 2019.
- REZENDE, D.C., et al. Antimicrobial activity of volatile organic compounds and their effect on lipid peroxidation and electrolyte loss in *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* mycelia. **Afr. J. Microbiol. Res.**, 9:1527-1535, 2015.
- RUIZ- MOYANO, S., et al. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica L.*) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. **Food microbiology**, 57, 45-53, 2016.
- SENGUN, I., YAMAN, D. B., & GONUL, S. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. **World Mycotoxin Journal**, 1(3), 291-298, 2008.
- SIPICZKI, M. Overwintering of vineyard yeasts: Survival of interacting yeast communities in grapes mummified on vines. **Frontiers in microbiology**, 7, 212, 2016.
- SIPICZKI, M., & HRABOVSKY, V. Diversity of *Galactomyces candidus* in the complex mycobiota of cow's milk bryndza cheese comprising antagonistic and sensitive strains. **International Journal of Food Microbiology**, 110088, 2023.
- TACZMAN-BRÜCKNER, A., et al. Mode of action of *Kluyveromyces lactis* in biocontrol of *Penicillium expansum*. **Acta alimentaria**, 34(2), 153-160, 2005.
- TARIQ, V.N., and V. M. CAMPBELL. Influence of volatile metabolites from *Geotrichum candidum* on other fungi. **Mycol. Res.** 95:891-893, 1991.
- UMESHA, S., et al. Aflatoxins and food pathogens: Impact of biologically active aflatoxins and their control strategies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97(6), 1698-1707, 2017.
- VIRGILI, R., et al. Biocontrol of *Penicillium nordicum* growth and ochratoxin A production by native yeasts of dry cured ham. **Toxins**, 4(2), 68–82, 2012.
- WOLF, I. V., et al. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggiano Argentinian cheese: Characterization of Reggiano Argentinian cheese. **Food Research International**, 43(4), 1204-1211, 2010.

YANG, Q., et al. Unveiling ochratoxin a controlling and biodetoxification molecular mechanisms: Opportunities to secure foodstuffs from OTA contamination. **Food and Chemical Toxicology**, 113437, 2022.

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

ZHANG, X., et al. The mechanisms involved in ochratoxin A elimination by *Yarrowia lipolytica* Y-2. **Annals of Applied Biology**, 173(2), 164-174, 2018.

ZHAO, X., ZHOU, J., TIAN, R., & LIU, Y. Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. **Frontiers in Microbiology**, 13, 922450., 2022.

ZHENG, X., SHI, X., & WANG, B. A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. **Frontiers in Microbiology**, 12, 703284, 2021.