



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CÂMPUS DE ARAGUAÍNA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE  
PÚBLICA NOS TRÓPICOS**

**ISAC GABRIEL CUNHA DOS SANTOS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E POTENCIAL DETERIORANTE DE FUNGOS  
LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS ISOLADOS EM QUEIJOS TIPO MINAS  
FRESVAL COMERCIALIZADOS INFORMALMENTE NA REGIÃO NORTE DO  
TOCANTINS**

Araguaína-TO

2021

**ISAC GABRIEL CUNHA DOS SANTOS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E POTENCIAL DETERIORANTE DE FUNGOS  
LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS ISOLADOS EM QUEIJOS TIPO MINAS  
FRESVAL COMERCIALIZADOS INFORMALMENTE NA REGIÃO NORTE DO  
TOCANTINS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Bruna Alexandrino  
Coorientador: Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior  
Coorientador: Prof. Dr. Taídes Tavares dos Santos

Araguaína-TO

2021

**ISAC GABRIEL CUNHA DOS SANTOS**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E POTENCIAL DETERIORANTE DE FUNGOS  
LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS ISOLADOS EM QUEIJOS TIPO MINAS  
FRESCAL COMERCIALIZADOS INFORMALMENTE NA REGIÃO NORTE DO  
TOCANTINS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da  
Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde  
Pública nos Trópicos.

Data da Aprovação: 04/03/2021

Banca examinadora:

Bruna Alexandrino

Profa. Dra. Bruna Alexandrino, Orientadora, PPGSASPT - UFT.

José Carlos Ribeiro Júnior

Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior, PPGSASPT - UFT

Cátia Maria de Oliveira Lobo

Profa. Dra. Cátia Maria de Oliveira Lobo, UFT

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

- S237d Santos, Isac Gabriel Cunha dos .  
Diversidade genética e potencial deteriorante de fungos leveduriformes e filamentosos isolados em queijos tipo Minas Frescal comercializados informalmente na região norte do Tocantins. / Isac Gabriel Cunha dos Santos. – Araguaína, TO, 2021.  
45 f.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2021.  
Orientadora : Bruna Alexandrino  
Coorientador: José Carlos Ribeiro Júnior  
1. Produtos de origem animal. 2. Saúde Pública. 3. Penicillium spp.. 4. Sacarolítico. I. Título

**CDD 636.089**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, senhor de tudo e meu mestre, pois até aqui Ele me ajudou.

A minha família, meu pai Nilson e mãe Valdenice, que sempre me deram amor, educação e todo o suporte necessário. Aos meus irmãos Henrique, Amanda e Alana que de alguma forma sempre me concederam ajuda. A terceira igreja presbiteriana de Araguaína, por todo cuidado e zelo pela minha vida espiritual. A minha namorada companheira, de horas boas e ruins, Bianca, que me deu apoio em todos os momentos.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Bruna Alexandrino, que esteve sempre disposta a ajudar, e que por mais que estivesse se ausentado (por um momento precioso da sua vida, a chegada do bebê Gustavo) fisicamente, sempre esteve preocupada com o desenvolvimento do projeto. Muito Obrigado!

Ao meu coorientador Prof<sup>o</sup> Dr. José Carlos que sempre se prontificou a ajudar, rompendo barreiras para que tudo ocorresse da melhor forma, agradeço pela paciência de me ensinar, serei eternamente grato, professor! E sim, é um exemplo de profissional no qual me espelho.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Taídes Tavares que além de amigo, foi o profissional que me incentivou e mostrou o quão grandioso é o universo da micologia, teve a paciência de me ensinar técnicas laboratoriais e não mediu esforços para que esse momento chegasse.

À técnica Cristiane (Cris) que me ajudou nas diversas atividades da rotina no laboratório, aqui fica meu eterno agradecimento!

Agradeço por demais, hoje doutoranda em medicina tropical, Monike Oliveira que por diversas vezes me ajudou na bancada do laboratório, me deu diversas caronas, sem falar nas amostras, e que inúmeras vezes transformou o trabalho pesado em uma rotina mais leve.

Agradeço aos demais que compõe a família LabMa: Ézio, Xuxa, Yron, Aelton, Maylla, Amanda, Rogério, Hellen, Carol, Thayná e Ferraresi que unidos mostram um trabalho incomparável, sendo uma equipe vencedora! Muito Obrigado, vocês são excelentes!

Agradeço também ao PIVIC Mateus Marques, que me acompanhou durante um grande período, me ajudando na execução do projeto. Muito Obrigado!

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Cadeia Produtiva do Leite (INCT-Leite) e ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia – PROCAD/Amazônia da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES/Brasil.

## RESUMO

O queijo é um produto resultante da coagulação enzimática do leite, complementado ou não com bactérias lácticas específicas. A composição comum do queijo favorece a multiplicação de micro-organismos patogênicos. A contaminação fúngica desse produto pode comprometer a qualidade, pois tais agentes tem alto potencial deteriorante, além de trazer riscos para a saúde pública. Objetivou-se nesse estudo verificar a diversidade genética e o potencial deteriorante de fungos leveduriformes e filamentosos isolados em 20 amostras de queijos tipo Minas Frescal comercializados de forma ilegal, em feiras livres na região norte do Tocantins. Foram realizadas contagens de fungos filamentosos e leveduriformes, verificação da atividade proteolítica, lipolítica e sacarolítica em diferentes temperaturas dos isolados obtidos e identificação dos gêneros dos fungos filamentosos e identificação das espécies de leveduras por meio da amplificação das regiões espaçadoras transcritas internas (ITS) do DNA, sequenciamento e identificação por similaridade usando a ferramenta BLAST para comparação com as sequencias depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Foi observado que 45% das amostras de queijo tiveram a presença de fungos filamentosos e 100% a presença de leveduras, apresentando contagem média  $7,6 (\pm 2,6) \times 10^5$  UFC/g. O gênero de fungo filamentoso predominante foi o *Penicillium* spp., representando 47,36% (9/19) das morfoespécies, sendo um gênero conhecido por conter espécies produtoras de micotoxinas. A espécie de levedura predominante foi a *Kluveromyces lactis* seguida da *Clavispora lusitaniae*. Dos fungos filamentosos isolados 73,68% (14/19) tem potencial proteolítico, sendo que quatro (21,05%) tiveram crescimento tanto em temperatura mesófila como psicotrófica. A atividade proteolítica de leveduriformes foi de 64% (16/25), das quais 37,50% (6/16) dessas produziram proteases em temperatura psicotrófica. Dos filamentosos, 89,47% (17/19) tiveram atividade lipolítica, na qual 57,89% produziram lipases nas duas temperaturas submetidas. Com relação às leveduras, 92% (23/25) tiveram atividade lipolítica sendo 86,95% (20/25) psicotrófica. Em relação à atividade acidificante em diferentes açúcares, a maioria dos isolados teve maior ação sobre a dextrose, tanto filamentosos quanto leveduriformes. Conclui-se que os queijos clandestinos comercializados em feiras livres em Araguaína são inapropriados para o consumo e são necessárias políticas públicas que acentuem a educação sanitária e que a fiscalização seja mais intensiva coibindo a comercialização ilegal de produtos e subprodutos de origem animal que podem oferecer risco ao consumidor.

**Palavras-chave:** *Penicillium* spp., Produtos de Origem Animal, Saúde Pública. Sacarolítico

## ABSTRACT

Cheese is a product resulting from the enzymatic coagulation of milk, complemented or not with specific lactic bacteria. The common cheese composition favors the multiplication of pathogenic microorganisms. The fungal contamination of this product can compromise the quality, as these agents have a high deteriorating potential, in addition to posing risks to public health. The objective of this study was to verify the genetic diversity and the damaging potential of yeast and filamentous fungi isolated in 20 samples of Minas Frescal cheeses sold illegally, in open markets in the northern region of Tocantins. Filamentous and yeast-yeast fungi counts were performed, verification of proteolytic, lipolytic and saccharolytic activity at different temperatures of the obtained isolates. The amplification of the internal transcribed spacer regions (ITS) of the DNA, sequencing and identification by similarity using the BLAST tool for comparison with the sequences deposited in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). It was observed that 45% of the cheese samples had the presence of filamentous fungi and 100% the presence of yeasts, with an average count of  $7.6 (\pm 2.6) \times 10^5$  CFU / g. The predominant genus of filamentous fungus was *Penicillium* spp., Representing 47.36% (9/19) of morphospecies, being a genus known for containing mycotoxin-producing species. The predominant yeast species was *Kluyveromyces lactis* followed by *Clavispora lusitaniae*. Of the isolated filamentous fungi 73.68% (14/19) have proteolytic potential, with four (21.05%) growing in both mesophilic and psychrotrophic temperatures. The proteolytic activity of yeasts was 64% (16/25), of which 37.50% (6/16) of these produced proteases at psychrotrophic temperature. Of the filaments, 89.47% (17/19) had lipolytic activity, in which 57.89% produced lipases at the two temperatures submitted. Regarding yeasts, 92% (23/25) had lipolytic activity and 86.95% (20/25) were psychrotrophic. Regarding the acidifying activity in different sugars, most of the isolates had a greater action on dextrose, both filamentous and yeast. It is concluded that clandestine cheeses marketed in open markets in Araguaína are unsuitable for consumption and public policies are needed that enhance health education and that inspection is more intensive, preventing the illegal commercialization of products and by-products of animal origin that may pose a risk. to the consumer.

**Key words:** *Penicillium* spp., Products of Animal Origin, Public Health. Saccharolytic

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** A) Crescimento de fungos leveduriformes e filamentosos em ágar DRBC; B) Fungos leveduriformes purificados em BDA; C) Fungo filamentoso purificado em BDA, isolados em queijo tipo Minas Frescal clandestino, oriundo de feira livre no município de Araguaína/TO ..... 23
- Figura 2** Halos de proteólise de leveduras em ágar BDA/Leite (A) e de fungos filamentosos (B) isolados em queijo tipo Minas Frescal clandestino, oriundo de feira livre no município de Araguaína/TO ..... 25
- Figura 3** Halos de leveduras (A) e fungos filamentosos (B) em Ágar trinitirina isolados de queijo tipo Minas Frescal clandestino, adquirido em feiras livres no município de Araguaína/TO, no período de abril a junho de 2019..... 26
- Figura 4** Mudança de coloração de colônias de leveduras (A) e fungos filamentosos (B) pela acidificação do meio de cultura para fermentação de açúcares, isolados de queijo tipo Minas Frescal clandestino, adquirido em feiras livres no município de Araguaína-To, no período de abril a junho de 2019..... 27
- Figura 5** Fungos do gênero (A) *Penicillium*, (B) *Fusarium*, (C) *Aspergillus* isolados de amostras de queijo tipo Mias Frescal comercializados informalmente em feiras livres no município de Araguaína-TO no período de abril a junho de 2019, identificados a partir da técnica de microcultivo, visualizados por microscopia óptica de 400x..... 30

**Quadro 1** Gêneros e frequências de isolamentos de fungos filamentosos e leveduriformes em queijos.....

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Fungos filamentosos e leveduriformes isolados de amostras de queijo tipo Minas Frescal comercializados ilegalmente em feiras livres no município de Araguaína Tocantins, no período de abril a junho de 2019..... 28
- Tabela 2** Atividade proteolítica, lipolítica e sacarolítica dos fungos filamentosos e isolados nos queijos tipo Minas Frescal comercializados de forma ilegal em feiras livres de Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019..... 32
- Tabela 3** Atividade proteolítica, lipolítica e sacarolítica de fungos leveduriformes isolados nos queijos tipo Minas Frescal comercializados de forma ilegal em feiras livres de Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019 ... 34

## LISTA DE ABREVIACOES

AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAP	gar base ppura de bromocresol
BDA	gar batata dextrose
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Corao
DON	Deoxinivalenol
DRBC	gar dicloran rosa bengala cloranfenicol
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
ITS	Regiões espaçadoras transcritas internas
OTA	Ocratoxina
PCR	Reao em cadeia da polimerase
RDC	Resoluo de Diretoria Colegiada

## Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
3.1 O queijo .....	15
3.2 Diversidade de fungos leveduriformes e filamentosos frequentes em queijos.....	16
3.3 Deterioração fúngica em queijos .....	18
3.4 Risco ao consumidor de produtos de origem animal clandestino .....	19
3.4.1 Risco micológico ao consumidor do queijo tipo Minas Frescal clandestino .....	20
4 METODOLOGIA.....	22
4.1 Amostragem .....	22
4.2 Processamento das amostras para o isolamento fúngico .....	22
4.3 Isolamento fúngico .....	22
4.4 Conservação de fungos filamentosos e leveduriformes .....	23
4.5 Identificação de fungos filamentosos e leveduriformes .....	23
4.6 Verificação da atividade proteolítica de estirpes fúngicas associadas ao queijo tipo Minas Frescal em diferentes condições de temperaturas.....	25
4.7 Verificação da atividade lipolítica de estirpes fúngicas isoladas em diferentes condições de temperatura.....	25
4.8 Verificação da atividade sacarolítica em diferentes açúcares de estirpes fúngicas em diferentes condições de temperatura.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS .....	37
APÊNDICE .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a fabricação de queijos vem aumentando no decorrer do tempo. No ano de 2017, a produção se sobressaiu 2% quando comparada ao ano anterior, alcançando mais de 950 mil toneladas, fazendo com que esse total desencadeasse uma movimentação de 18 bilhões de reais ao ano (ANUÁRIO LEITE, 2018).

Cerca de um terço da produção leiteira brasileira é destinada a fabricação de queijos, sendo este produto caracterizado como o de maior aceitação pelo consumidor (EMBRAPA, 2018). Neste contexto, o estado do Tocantins, produziu 385,563 milhões de litros de leite no ano de 2016, sendo o município de Araguaína produtor de 5,654 milhões de litros na mesma época (IBGE, 2016).

Queijo é o produto lácteo fresco ou maturado que se obtém por meio da separação parcial do soro em relação ao leite, ou ao leite reconstituído, coagulados pela ação do coalho, de enzimas específicas, produzidas por micro-organismos específicos, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos podendo ser consumidos com ou sem acréscimo de substâncias alimentícias, de especiarias, de condimentos ou de aditivos; sendo o queijo fresco o que está apto para o consumo logo após a sua fabricação (BRASIL, 2017).

As características organolépticas do queijo resultam principalmente da sua microbiota, o que inclui bactérias, fungos filamentosos (bolores) e leveduriformes. Grande parte das leveduras contribui para o sabor e aroma do queijo (GADAGA; MUTUKUMIRA e NARVHUS, 2000). Muitos dos filamentosos são utilizados para se alcançar as características desejáveis no queijo fresco. Todavia, a contaminação micológica nos queijos, pode provocar a diminuição da vida útil do produto, uma vez que pode ser caracterizados como deteriorantes, podendo ser sacarolíticos, lipolíticos e ou proteolíticos, utilizando de substratos fornecidos pelo queijo para obtenção de energia e conseqüentemente o seu desenvolvimento (SOUZA, 2016; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017).

Os fungos podem agir no queijo frescal trazendo prejuízos, podendo ter várias origens, como a matéria-prima, ar ambiente, água, utensílios utilizados e por meio da manipulação inadequada (BANJARA et al., 2015).

Algumas leveduras específicas presentes na superfície do queijo trazem prejuízos para qualidade do mesmo. Embora seja difícil a associação de leveduras com Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), estudos denotam espécies com importância médica

em diversos queijos, tais como *Candida tropicalis*, *C. glabrata* (GADAGA; MUTUKUMIRA e NARVHUS, 2000) e *C. albicans* (ARRUDA e MENEGHELLO, 2013).

Os fungos filamentosos podem produzir metabólitos secundários denominados de micotoxinas, que trazem perigos para a saúde do consumidor (BANJARA et al., 2015). A aflotoxina B1 e a Ocratoxina são exemplos de micotoxinas altamente carcinogênicas produzidas por várias espécies de fungos, tais como o *Aspergillus flavus* e o *A. ochraceus* (SAVI; ZENAIDE, 2020).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar a diversidade genética e o potencial deteriorante de fungos leveduriformes e filamentosos isolados em queijos tipo minas frescal comercializados de forma ilegal na região norte do Tocantins.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Isolar e quantificar os fungos filamentosos e leveduriformes cultiváveis associados a amostras de queijos frescais;
- Caracterizar os isolados macro e micromorfológicamente e agrupar em morfoespécies;
- Identificar, até o menor nível taxonômico possível, os isolados fúngicos detectados e;
- Determinar a atividade proteolítica, lipolítica e sacarolítica em diferentes temperaturas dos fungos obtidos;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O queijo

De acordo com a Portaria nº 146/1996, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, coagulada pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Os queijos são concentrados proteicos de leite. A concentração se consegue eliminando uma maior quantidade de água e elementos solúveis. O que fica é formado essencialmente pela caseína e gordura aderidas fisicamente (AMIOT, 1991), sendo um meio valioso para conservar muitos nutrientes do leite (ADAMS e MOSS, 1997), como vitaminas e minerais, principalmente cálcio, ferro e fósforo, proteína e gordura (VARNAM e SUTHERLAND, 1995). Além de seu valor nutritivo, o queijo também é apreciado pelo seu sabor, que atende aos mais exigentes paladares (ARAÚJO, 2001). Por ter alto valor nutritivo, o queijo também é um produto que favorece a multiplicação de micro-organismos, e em destaque o queijo tipo Minas Frescal (OLIVEIRA, 2020). Este queijo é caracterizado como semi-gordo e de muita alta umidade, sendo que o leite a ser utilizado deve ser submetido a um tratamento térmico específico, ou tratamento térmico equivalente, combinado ou não com outros processos físicos e biológicos que garantam a inocuidade do produto (BRASIL, 1997).

As características deste tipo de queijo como o alto teor de umidade, baixo teor de sal e ausência de maturação, favorece contaminações, que podem ocorrer desde a ordenha até o pós-processamento (PASSOS et al., 2009). Além disso, a maioria do leite empregado para a fabricação de queijos informais não passa por tratamento térmico que tenha como objetivo diminuir ou eliminar contaminações (MEDEIROS et al., 2013). Na maioria das vezes, os manipuladores desse tipo de alimento não têm preparo ou conhecimento para manusear de forma mais correta a fabricação do queijo, culminado assim para uma produção inadequada podendo contaminar com micro-organismos patogênicos, sendo ele bacteriológico ou micológico, trazendo risco a saúde pública (AMORIM et al., 2014).

### 3.2 Diversidade de fungos leveduriformes e filamentosos frequentes em queijos

Os produtos de origem animal, desde a matéria prima, podem ser alvo de contaminação por micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, trazendo risco a saúde do consumidor e comprometendo a segurança química do alimento (EMPRAPA, 2016). O crescimento de leveduras e fungos filamentosos pode resultar em características indesejáveis, como perda de sabor, descoloração, além da produção de metabólitos denominados de micotoxinas, caracterizando-se, assim, como um problema de impacto econômico e na saúde pública (FILTENBORG; FRISVAD e THIRANE, 1996).

A presença de fungos leveduriformes e filamentosos em queijos produzidos por leite cru podem ter origem na matéria prima, no armazenamento inadequado, na refrigeração intercalada, no local inapropriado para exposição e comercialização do produto (FLORENTINO & MARTINS, 1999). Algumas estirpes de fungos são fundamentais para a maturação de diferentes tipos de queijo, denominados como queijos azuis tais como o roquefort, gorgonzola, camembert e stilton; porém, em sua maioria, os fungos tem o crescimento indesejável. A proliferação dos fungos nos queijos é limitada à quantidade de oxigênio residual, sendo que níveis menores podem determinar as espécies encontradas (RIBEIRO et al., 2020).

A frequente ocorrência da contaminação de queijos por fungos filamentosos tem gerado preocupação pelo fato da possível produção de micotoxinas, sendo os agentes filamentosos mais encontrados os do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* (LAVOIE et al., 2012; HYMERY et al., 2014). Porém, estudos denotam a contaminação também por fungos do gênero *Fusarium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Trichoderma*. (CALLON et al., 2007; BUDAK et al., 2016; RIBEIRO et al., 2020).

Os fungos leveduriformes são micro-organismos que tem alto potencial de deterioração. Se desenvolvem em produtos com pH baixo e elevados teores de sal, tem a capacidade de manter o seu crescimento também em temperaturas baixas e são resistentes a estresses físico-químicos importantes, como métodos utilizados para a preservação de alimentos (BERESFORD et al., 2001). As leveduras mais presentes nos queijos são do gênero *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluveromyces*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Zgosaccharomyces* e *Kodamaea* (JACQUES e CASAREGOLA, 2008; BÜCHL e SEILER, 2011).

Algumas espécies do gênero *Debaryomyces* podem afetar a esporulação e o crescimento de fungos filamentosos, pois essas leveduras têm atividade de controle

biológico, principalmente *Debaryomyces hansenii* (MEDINA-CÓRDOVA et al., 2018). As espécies *D. hansenii*, *Kodamaea ohmeri* e *Kluyveromyces marxianus* são leveduras que trazem benefícios à produção de queijo minas artesanal, isso devido ao potencial enzimático das mesmas, que proporciona a formação de compostos aromáticos que são características desejáveis para este alimento (CARDOSO et al., 2015).

As leveduras *Kluyveromyces lactis*, *Torulasporea delbrueckii* e *Candida intermedia*, também desempenham um papel favorável para agregar sabor e aroma para queijos minas artesanal, por serem produtoras de compostos aromáticos (ANDRADE et al., 2017). Diversos estudos mostram a frequência de isolados fúngicos em queijos, como mostra o quadro 1.

**Quadro 1 - Gêneros e frequências de isolamentos de fungos filamentosos e leveduras em queijos**

<b>Autores</b>	<b>Tipos de queijo</b>	<b>Número amostral</b>	<b>Gênero</b>	<b>(%)</b>
Aragão, 2018	Queijo Minas Artesanal	6	<i>Aspergillus</i>	73,6
			<i>Geotrichum</i>	84,8
			<i>Candida</i>	42,8
Ferreira Junior, 2012	Queijo de Coalho	20	<i>Penicillium</i>	80,1
			<i>Cladosporium</i>	40,2
Silva, 2003	Queijo Minas Frescal	31	<i>Candida</i>	38,06
			<i>Debaryomyces</i>	54,84

Fonte: Elaborado pelo autor.

Aragão (2018), avaliando a diversidade de fungos filamentosos e leveduriformes em queijo minas artesanal, observou que, dentre a maior parte dos isolados de fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus* teve uma quantidade mais expressiva. A frequência desse gênero é preocupante por ter um alto potencial de produção de micotoxinas, dentre elas a ocratoxina A (RODRIGUES et al., 2019). Dentre as ocratoxinas, esta se torna uma das mais relevantes, por apresentar características nefrotóxicas, teratogênicas e neurotóxicas (RODRIGUES et al., 2019).

O *Geotrichum* é um dos principais gêneros de fungos leveduriformes desejáveis, desde a matéria prima, sendo grande parte das vezes utilizado como fermento nos laticínios, e propaga-se na maioria dos queijos curados por superfície durante os primeiros estágios de maturação dando textura, coesão e espessura da casca (BOUTROU e GUÉGUEN, 2005).

Nos estudos de Silva (2003) os gêneros *Candida* e *Debaryomyces* se sobressairam, este estudo avaliou a qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijo tipo Minas Frescal. *Candida* é o gênero de leveduras mais comumente encontrado (SILVA, 2003), estando envolvida de forma direta em processos de deterioração em vários tipos de queijos, tornando indesejável neste alimento (ALMEIDA, 2011). Já o gênero *Debaryomyces* é caracterizado principalmente por ter pouca atividade fermentativa e elevada tolerância ao sal (18,0 a 20,0%) (BUTINAR et al., 2005; FLEET, 2003; SILVA, 2009).

### 3.3 Deterioração fúngica em queijos

A presença de fungos filamentosos e leveduras em queijos é indesejável, pois muitos deles são deteriorantes. Quanto maior a contagem destes micro-organismos, maiores são as deficiências de higiene na planta do processamento ou matéria prima (BANJARA et al., 2015).

Os filamentosos em sua maioria são aeróbios e geralmente produzem enzimas que atuam sobre diferentes nutrientes. Algumas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus* produzem proteinases e lipases extracelulares (SOUZA et al., 2016).

As leveduras por sua vez, apresentam características parecidas com os filamentosos e por isso podem utilizar de substratos como o carboidrato para o seu desenvolvimento, além de utilizarem condições seletivas como um baixo pH e atividade de água inferior a 0,94 (ALMEIDA, 2011).

O queijo é composto por elementos tais como: água, proteínas, gordura, sais e lactose; dependendo do substrato utilizado pelos fungos para o seu desenvolvimento, podem ser classificados em três diferentes grupos: proteolíticos, lipolíticos e sacarolíticos (BELOTI, 2015).

As enzimas proteolíticas produzidas pelos fungos agem em sua maioria sobre a k-caseína, acarretando a desestabilização das micelas de caseína; essas enzimas favorecem a formação de aminoácidos não desejáveis durante a maturação de alguns queijos e alteração nas características organolépticas, como o sabor amargo, sendo associada a sua presença como problema tecnológico (RIBEIRO JÚNIOR, 2017). Estudos mostram que a presença dessas enzimas no leite, promove diversos problemas, independente dos processos de pasteurização ou o tratamento UHT, os micro-organismos se mostram

sensíveis, mas as enzimas são estáveis em tratamentos térmicos (RECIO et al., 2000; MARIOTO et al., 2020).

Os agentes lipolíticos, da mesma forma que os proteolíticos têm grande impacto na produção desses alimentos, pois comprometem a qualidade do produto (BELOTI, 2015). Estas enzimas produzidas pelas leveduras e fungos filamentosos, denominadas de lipases, hidrolisam gorduras tanto do leite, como dos derivados; e os ácidos graxos, de cadeia curta, liberados no decorrer da lipólise são vulneráveis a oxidação, surgindo assim, compostos que alteram as características desejáveis, desenvolvendo a rancificação, tornando o queijo inapropriado para o consumo, ocasionando a rejeição pelo consumidor (MARIOTO et al., 2020).

Sacarolíticos são os micro-organismos que utilizam carboidratos como substrato para o seu desenvolvimento, dentre eles, a lactose (JAY, 2000). A lactase ( $\beta$ -galactosidase) hidrolisa o dissacarídeo formando  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-glicose (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985). Essa enzima tem uma melhor atividade sacarolítica a 35°C e pH entre 6,9 e 7,3 (ANDRADE, 2005). Assim, apresenta atividade quando o produto é submetido em temperatura mesófila (SÁ et al., 2017). A ação dessa enzima resulta na produção de ácidos, grande quantidade de gás e álcool (TRONCO, 2008).

### **3.4 Risco ao consumidor de produtos de origem animal clandestino**

Produtos de origem animal que não passam pelo processo de inspeção sanitária podem apresentar malefícios ao consumidor, promovendo riscos a sua saúde, como as DTAs. Ainda que sejam obtidos de animais saudáveis, são carreadores de riscos biológicos, físicos e químicos (ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELL, 2005).

O consumo de alimentos clandestinos podem ocasionar ao consumidor infecções, quando houver a ingestão de alimentos que contenham organismos patogênicos; toxinfecção na ocasião de ingestão de alimentos que apresentam organismos prejudiciais à saúde e que liberam substâncias tóxicas; e intoxicação, quando há ingestão de alimentos com substâncias tóxicas, como por exemplo, as de origem fúngica, chamadas de micotoxinas; a sintomatologia das DTAs podem alternar de acordo com o microrganismo, toxina e quantidade do alimento ingerido, sendo que os sintomas mais vistos são gastroenterite, vômito, dor abdominal, cefaleia e febre (BRASIL, 2008).

A presença de micotoxinas tem sido associada com alguns surtos de DTAs. Em 1974 houveram registros de aflatoxicoses em 397 pessoas em estados vizinhos no noroeste da Índia (SAVI; ZENAIDE, 2020), o qual levou 108 pessoas ao óbito. Em 2004, foram responsáveis por uma epidemia onde houve 317 casos foram notificados e uma taxa de letalidade de 39% no Kenya (PROBST; NJAPAU e PETER, 2007). Os casos de subnotificações são elevados devido as dificuldades de assistência médica e diagnóstico em áreas de altos níveis de contaminação em alimentos (MS, 2008).

No Brasil existem três esferas legais que tem como objetivo a inspeção sanitária e industrial de produtos de origem animal; o serviço de inspeção federal (SIF), no qual se registram os estabelecimentos que fazem o comércio entre estados e exportações; o serviço de inspeção estadual (SIE), onde são registrados os estabelecimentos que comercializam produtos entre municípios; e o serviço de inspeção municipal (SIM), no qual são registrados os estabelecimentos que comercializam produtos dentro do município (ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCECELL, 2005; BRASIL, 2017). Estes têm como objetivo garantir a qualidade do alimento desde a sua origem até o consumidor, proporcionando a população um produto saudável e apto ao consumo (BRASIL, 2017).

#### 3.4.1 Risco micológico ao consumidor do queijo tipo Minas Frescal clandestino

As características do processamento do leite, podem favorecer uma alta contaminação do queijo tipo Minas Frescal, além da forma que é embalado, transportado e comercializado (PASSOS et al., 2009). Os queijos informais em sua maioria são produzidos por leite cru, além de não passar por nenhum processo que venha inibir sujidades ou contaminações (OLIVEIRA, 2020). Muitas das vezes a falta de conhecimento do produtor, favorece a manipulação inadequada, desprovida de higiene, proporcionando, ainda mais, um produto inapto ao consumo (PASSOS et al., 2009; AMORIM et al., 2014). A contaminação micológica nesse alimento é preocupante, uma vez que alguns gêneros de fungos filamentosos produzem micotoxinas proporcionando um grande risco a saúde do consumidor.

Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas são as que mais se destacam, e em sua maioria são produzidas por algumas espécies do gênero *Aspergillus*; sendo a aflatoxina B1 (AFB1) considerada a mais tóxica que ocorre naturalmente (RODRIGUES et al., 2020). Essa substância é metabolizada no fígado, pelo sistema do citocromo P450, formando a aflatoxina M1 (AFM1), uma hepatotóxica e supressor imunitário classificado como um

carcinógeno grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2002). Estudos em vacas mostram que a AFM1 foi detectada no leite e na urina seis horas após a ingestão de AFB1 (QUEIROZ et al., 2012; OGUNADE et al., 2016).

Outra toxina que o consumidor está susceptível quando ingere queijos clandestinos é a deoxinivalenol, que é produzida por fungos do gênero *Fusarium* e pode ocasionar vômitos, efeitos imunotóxicos e mudanças neuroquímicas no cérebro, além de ser um potente inibidor de síntese proteica (ESCRIVÁ; FONT e MANYES, 2015). A ocratoxina também é uma toxina com propriedades cancerígena, teratogênica e nefrotóxica; é um metabolito secundário produzido por fungos do gênero *Penicillium*, como *P. nordicum* e do gênero *Aspergillus*, como exemplo o *A. carbonarius* onde tem ocorrência em vários países, sendo isolada principalmente em grãos (RODRIGUES et al., 2020). além das micotoxinas mencionadas, existem muitas outras toxinas que trazem malefícios a saúde do consumidor como a citrinina, fumonisinas e zearalenona (ALSHANNAQ e YU, 2017).

As micotoxicoses ocorrem mundialmente. Em um estudo em comunidades rurais no norte da Nigéria contendo 120 pacientes entre crianças, adolescentes e adultos, foi investigada a exposição a toxinas através da análise da urina (EZEKIEL et al., 2014), no qual, os resultados mostraram que 50,8 % (61/120) das amostras tinham ocratoxina, 14,2%(17/120) AFM1 e 13,3% (16%) AFB1. Mostrou-se ainda nesse estudo que as toxinas encontradas, também estavam presentes nos alimentos consumidos pelos voluntários, mostrando uma correlação da alimentação com a exposição de micotoxinas.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Amostragem**

As amostras foram adquiridas em feiras livres no município de Araguaína/TO. No município existiam três feiras livres e apenas uma ou duas barracas por feira comercializavam o queijo fresco. Sendo assim, foram analisadas 20 amostras de queijos tipo Minas Frescal, entre abril e junho de 2019. As amostras foram adquiridas, identificadas, acondicionadas em caixa isotérmica com gelo nas mesmas embalagens colocadas pelo vendedor, e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Araguaína/TO, Brasil.

### **4.2 Processamento das amostras para o isolamento fúngico**

No laboratório, em condições assépticas, cada queijo foi amostrado com cerca de 10 fragmentos pesando no total 25g. A amostra foi colocada em saco plástico contendo 225mL de água peptonada, formando a diluição  $10^{-1}$ . Em seguida, homogeneizou-se com auxílio do aparelho Stomacher Lab 400 por 180 segundos. Realizou-se então as diluições decimais seriadas até  $10^{-4}$  em tubos de ensaio contendo solução salina (0,85%) peptonada (0,01%) esterilizada. De cada diluição, 100 uL foram plaqueados em duplicata em meio de cultura Ágar Dicloran Rosa de Bengala e Cloranfenicol (DRBC), preparado conforme instruções do fabricante e vertido em placas de Petri de 90mm de diâmetro. As placas inoculadas foram incubadas aerobicamente por cinco dias a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (SILVA et al., 2017). A partir dessa etapa, os procedimentos foram realizados no Laboratório de Higiene e Saúde Pública da Universidade Federal do Tocantins, Campus Araguaína/TO.

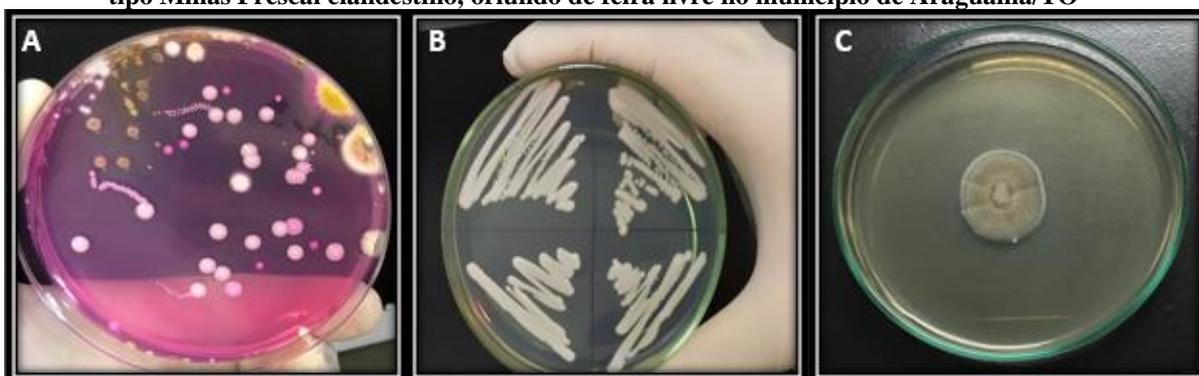
### **4.3 Isolamento fúngico**

Após o período de incubação, as colônias de fungos filamentosos foram caracterizadas macroscopicamente, contadas, isoladas e agrupadas em morfotipos em cada amostra. As colônias com aspecto de levedura foram analisadas por microscopia a fresco para confirmação e distinção em relação às bactérias. O isolamento, tanto dos fungos filamentosos como leveduriformes ocorreu a partir do repique do DRBC para o Ágar

Dextrose Batata (BDA) e depois dos repiques sucessivos contínuos em BDA para que se obtivesse fungos isolados e purificados por placa, como mostra a Figura 1.

O cálculo da contagem de UFC foi realizado através da média entre as placas (duplicata), logo após foram transformados por mL e corrigidos pelo fator de diluição (número de colônias das duas placas/ 2) x 10 (para transformar em mL) x a diluição que foi feita a contagem (exemplo: quando a leitura foi feita na diluição  $10^{-2}$  foi multiplicado por 100 (SILVA et al., 2017).

**Figura 1. A) Crescimento de fungos leveduriformes e filamentosos em ágar DRBC; B) Fungos leveduriformes purificados em BDA; C) Fungo filamentoso purificado em BDA, isolados em queijo tipo Minas Frescal clandestino, oriundo de feira livre no município de Araguaína/TO**



Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.4 Conservação de fungos filamentosos e leveduriformes

Os fungos filamentosos purificados foram conservados pelo método de Castellani (1939), que consiste em vários repiques em tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada, enquanto que as leveduras foram conservadas pelo método realizado por Silva; Costa e Reche (2008), no qual, após purificadas, as leveduras foram repicadas em caldo cérebro-coração para sua multiplicação e, após dois dias, foram feitas alíquotas de 1,0 mL e adicionadas em microtubos com adição de 0,5mL de glicerina PA e conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5 Identificação de fungos filamentosos e leveduriformes

A identificação dos fungos filamentosos ocorreu a partir da repicagem de um representante de cada morfoespécie em BDA. Após cinco dias de crescimento, realizou-se a técnica do microcultivo (RIDDELL, 1950), que consiste no cultivo do fungo em pequenos fragmentos de meio de cultura, entre lâmina e lamínula, em câmara úmida, durante 10 dias. Após a expansão e fixação do fungo na porção inferior da lamínula,

retirou-se a mesma com cuidado para manter intactas as estruturas importantes para a taxonomia e adicionou a solução de azul de lactofenol. O preparado foi levado ao microscópio para visualização e identificação do maior nível taxinômico do fungo por meio de comparação das estruturas visualizadas com as disponíveis na literatura (PIZZIRANI KLEINER, 1998; ANVISA, 2004; FAIA, 2011).

Para identificação molecular de leveduras foi feito repique das amostras que estavam armazenadas no BHI com glicerina a  $-20^{\circ}\text{C}$  em placa de Petri contendo ágar BDA e incubadas em estufa por 48 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, fez-se outro repique para caldo cérebro coração (BHI) (Acumedia, Baltimore, USA) por 24 horas a  $35^{\circ}\text{C}$  para multiplicação e posteriormente extração de DNA genômico.

Para a extração do DNA foi realizado o método de Cheng e Jiang (2006). Um mL do caldo de cultura foi adicionado a um microtubo de centrifugação descartável de 1,5 mL livre de DNase, RNase e pirogênicos. Os microtubos foram centrifugados a 15.000 rpm por 3 min, sendo descartado o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado em homogeneizador com 400  $\mu\text{L}$  de tampão STE sendo novamente centrifugados a 13.000 rpm por 3 min e descartando-se o sobrenadante. Foram então adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão TE, homogeneizados e adicionados 100  $\mu\text{L}$  de fenol saturado equilibrado (pH 8,0) e agitado em vórtex por 2min. Em seguida procedeu-se a lavagem do material genético: 160  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos a um microtubo de centrifugação limpo e adicionados de 40  $\mu\text{L}$  de TE e 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. O processo de lavagem foi realizado por duas vezes. Foram recolhidos 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da última lavagem e adicionados em outro microtubo de centrifugação limpo e acondicionado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para a amplificação das regiões espaçadoras transcritas internas (ITS) do rDNA das leveduras foi utilizado oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 % (w/v) em tampão TBE 1 X (EDTA 2 mM, Tris-HCl 0,1 M, e ácido bórico 0,1 M [pH 8,0]) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001) e visualizados sob luz ultravioleta. Logo em seguida, os produtos da PCR foram purificados (PureLink™ Genomic DNA Purification Kit, Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, os produtos de PCR foram sequenciados pelo método de Sanger (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA) em ambas direções.

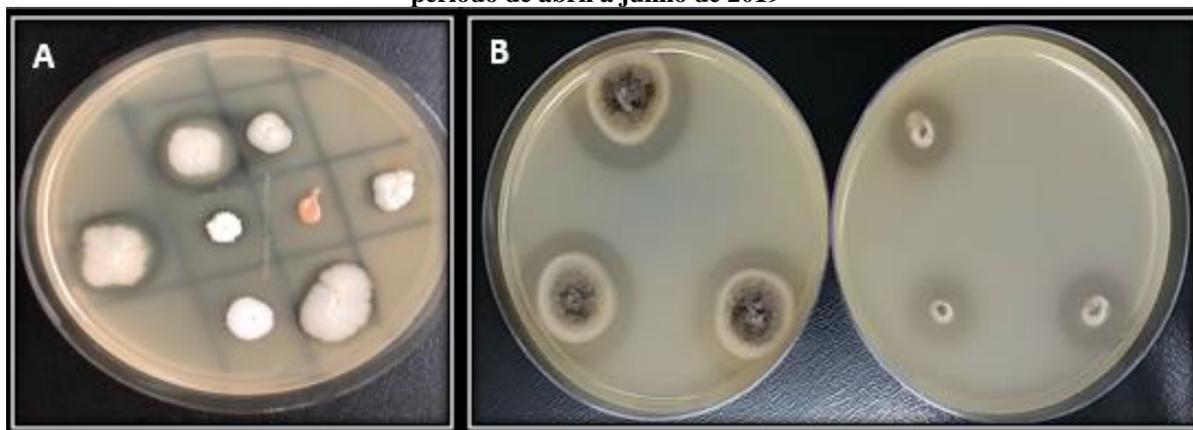
A qualidade das sequências foi avaliada pelo software BioEdit v. 7.2.5 (HALL, 1999) e as sequências consensuais foram geradas pelo CAP 3 (HUANG; MADAN, 1999).

A identificação foi realizada pelo Blast tool do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

#### 4.6 Verificação da atividade proteolítica de estirpes fúngicas associadas ao queijo tipo Minas Frescal em diferentes condições de temperaturas

Para verificação da atividade proteolítica das estirpes fúngicas isoladas, foi realizada a metodologia proposta por Ribeiro Júnior (2017), onde os isolados fúngicos foram repicados em placa de Petri contendo BDA suplementado (9:1) com uma solução estéril de leite em pó desnatado constituído (10%) para avaliar a atividade proteolítica. Foram feitas duas placas, uma incubada a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante cinco dias e a outra  $7 \pm 2^\circ\text{C}$  durante dez dias para comparar se o fungo era proteolítico ou não em temperatura mesófila e psicrótrófica, respectivamente. Na leitura dos resultados, a presença de halo translúcido significa que o fungo é proteolítico, e na ausência deste, se deu como negativo, ou seja, o fungo não é proteolítico, como mostra a Figura 2.

**Figura 2. Halos de proteólise de leveduras em ágar BDA/Leite (A) e de fungos filamentosos (B) isolados em queijo tipo Minas Frescal clandestino, oriundo de feira livre no município de Araguaína/TO, no período de abril a junho de 2019**



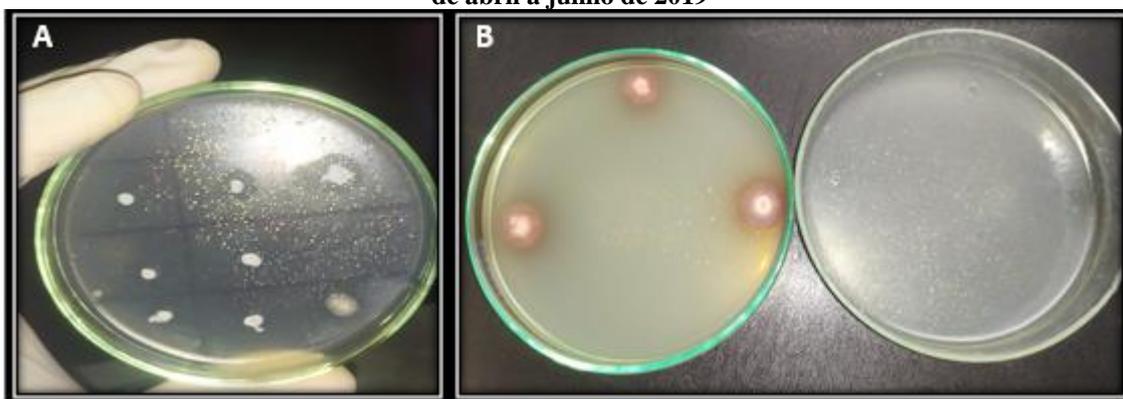
Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.7 Verificação da atividade lipolítica de estirpes fúngicas isoladas em diferentes condições de temperatura

Para verificação da atividade lipolítica foi utilizada a metodologia de Marioto et al. (2020). Para isto, os fungos foram repicados em duas em placas contendo ágar base tributirina (Himedia, Mumbai, India) suplementado com tributirina (Himedia, Mumbai,

Índia) na proporção de 99:1, sendo uma placa incubada a  $7 \pm 1$  °C por 10 dias, e a outra a  $25 \pm 1$  °C por 48 horas para leveduras, já para filamentosos, uma placa incubada por cinco dias a a  $25 \pm 1$  e outra a  $7 \pm 1$  °C por 10 dias para verificação da atividade lipolítica em temperatura psicrotrófica e mesófila, respectivamente. A atividade deteriorante foi obtida através da formação de halos de lipólise ao redor das colônias, como mostra a Figura 3.

**Figura 3. Halos de leveduras (A) e fungos filamentosos (B) em ágar tributirina isolados de queijo tipo Minas Frescal clandestino, adquirido em feira livre no município de Araguaína/TO, no período de abril a junho de 2019**

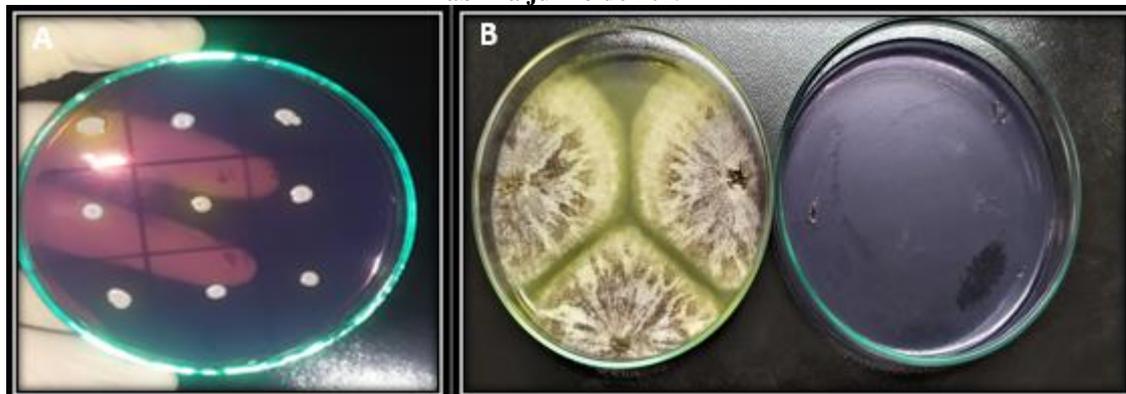


Fonte: Arquivo pessoal.

#### **4.8 Verificação da atividade sacarolítica em diferentes açúcares de estirpes fúngicas em diferentes condições de temperatura.**

Para avaliação da presença de atividade sacarolítica em diferentes açúcares, foi utilizada a metodologia proposta por SILVA et al. (2017). Para isto, os isolados de fungos leveduriformes e filamentosos foram repicados em três pontos em duas placas de Petri contendo ágar base púrpura de bromocresol (BAP), suplementado com lactose a 10% e repicados também em placas contendo BAP suplementado com dextrose a 10%, sendo uma placa incubada a  $25 \pm 1$  °C por 48h e outra a  $7 \pm 1$  °C por 10 dias para leveduras e para fungos filamentosos  $25 \pm 1$  °C por 5 dias e a  $7 \pm 1$  °C por 10 dias, para avaliar a atividade em temperatura mesófila e psicrotrófica respectivamente. A atividade acidificante foi observada através da alteração do pH no meio, apresentando coloração de aspecto amarelado ao redor da colônia, como mostra a Figura 4.

**Figura 4** Mudança de coloração de colônias de leveduras (A) e fungos filamentosos (B) pela acidificação do meio de cultura para fermentação de açúcares, isolados de queijo tipo Minas Frescal clandestino, adquirido em feiras livres no município de Araguaína-TO, no período de abril a junho de 2019



Fonte: Arquivo pessoal.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada a presença de fungos nas 20 amostras analisadas (100%). Em 9 (40%) amostras houveram a presença de fungos filamentosos e em todas, a presença de leveduriformes, conforme mostrado na tabela 1.

Determinando o nível de contaminação do queijo Minas em Salvador – BA, Araújo (2001) observou que 16% (1/6) das amostras avaliadas apresentaram contagem para fungos filamentosos e leveduras. Por mais que não tenha uma legislação (Portaria n.º 146/1996 – MAPA / BRASIL, RDC n.º12/2001) que estabeleça o padrão para os fungos em queijo tipo Minas Frescal, a presença desses micro-organismos nesse tipo de queijo pode acusar a qualidade higiênico-sanitária do alimento, uma vez que são indesejáveis e a sua presença indica um déficit na matéria prima, de higiene no processamento e/ou forma de comercialização.

As contagens de fungos filamentosos e leveduras variaram entre  $1,4 \times 10^4$  e  $12,7 \times 10^6$  com média de  $7,6 (\pm 2,6) \times 10^5$  se mostrando superiores quando comparado aos achados de Quintana e Carneiro (2007) que encontraram  $3,4 \times 10^2$  avaliando queijos minas comercializados em quitandas de Morrinhos – GO. A grande variação de contagem de leveduras e fungos filamentosos aponta para diversos parâmetros no processamento e na maneira de exposição dos queijos. A presença de sujidades é um fator inquestionável no presente trabalho, corroborando com observações realizadas no momento da aquisição. Os queijos comercializados nas feiras, não estavam acondicionados de maneira correta, estando assim expostos ao ar livre, e sem embalagens, sem nenhum tipo de refrigeração contribuindo para condições não satisfatórias.

Dos 19 fungos filamentosos isolados e identificados, 9 (47,36%) foram do gênero *Penicillium*, 3 (15,78%) do gênero *Fusarium*, 2 do gênero *Cladosporium*, 1 do gênero *Geotrichum*, 1 do gênero *Diplococcium*, 1 do gênero *Rhizophus* e 1 do gênero *Mucor* conforme mostra a Tabela 1.

O gênero *Penicillium* é conhecido por causar contaminação alimentar, são distribuídos em todo mundo, são fungos que esporulam bastante e por isto estão presentes nos solos e no ar, esse gênero é marcado também por seu potencial deteriorante (PITT, 2000). Na indústria de alimentos o *Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*, *P. glaucum*, *P. bilaiae*, *P. candida* estão ligados na fabricação de determinados tipos de queijo (CHAVEZ; BULL e EYZAGUIRRE, 2006). O *Penicillium comune* é um importante fungo

deteriorador de alimentos, principalmente em queijos, incluindo até mesmo queijos embalados a vácuo (KURE et al., 2002).

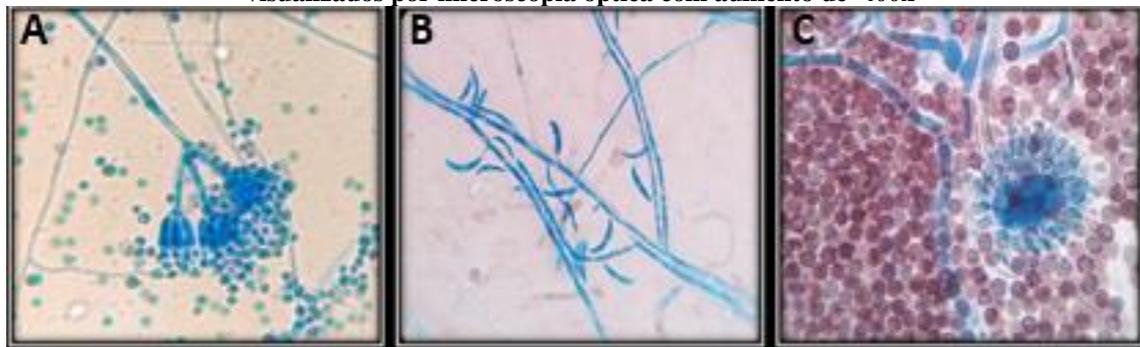
**Tabela 1 - Fungos filamentosos e leveduriformes isolados de amostras de queijo tipo Minas Frescal comercializados ilegalmente em feiras livres no município de Araguaína- TO, no período de abril a junho de 2019**

Amostras	Amostras de Queijos Tipo Minas Frescal	
	Filamentosos (Gênero)	Leveduriformes (Espécie)
1	<i>Penicillium</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
	<i>Geotrichum</i>	
2	<i>Aspergillus</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
3	-	<i>Kluveromyces lactis</i>
4	-	<i>Candida parapsilosis</i>
6	-	<i>Kluveromyces lactis</i>
7	<i>Diplococcium</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>
8	<i>Fusarium</i>	<i>Kluveromyces lactis</i>
9	-	<i>Kluveromyces lactis</i>
10	-	<i>Kluveromyces lactis</i>
11	<i>Penicillium</i>	<i>Candida metapsilosis</i>
		<i>Clavispora lusitaniae</i>
		<i>Candida spp.</i>
12	<i>Fusarium</i>	<i>Kluveromyces lactis</i>
	<i>Cladosporium</i>	
13	-	<i>Clavispora lusitaniae</i>
		<i>Kluveromyces lactis</i>
14	-	<i>Kluveromyces lactis</i>
		<i>Candida parapsilosis</i>
15	-	<i>Clavispora lusitaniae</i>
16	-	<i>Candida metapsilosis</i>
		<i>Clavispora lusitaniae</i>
17	<i>Fusarium</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
	<i>Penicillium</i>	
	<i>Rhizophus</i>	
18	<i>Penicillium</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
	<i>Cladosporium</i>	
	<i>Mucor</i>	
19	-	<i>Clavispora lusitaniae</i>
20	<i>Penicillium</i>	<i>Candida aaseri</i>

Fonte: Elaborada pelo autor.

O crescimento dessa espécie nesse produto ocasiona descoloração da superfície e a produção de um sabor desagradável (KURE et al., 2002). Produtor de diversas toxinas, a sua presença nos queijos se torna preocupante por ser um alimento com alta demanda (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2020), chegando assim a muitos indivíduos (BLAKISTON, 1982; TANIWAKI e SILVA, 2001).

**Figura 5. Fungos do gênero (A) *Penicillium*, (B) *Fusarium*, (C) *Aspergillus* sp., isolados de amostras de Queijo Minas Frescal e comercializados informalmente em feiras livres no município de Araguaína – TO, no período de abril a junho de 2019, identificados a partir da técnica de micocultivo, visualizados por microscopia óptica com aumento de 400x**



Fonte: Arquivo pessoal

Souza (2016) avaliando a ocorrência de fungos deteriorantes e de micotoxinas em queijo parmesão observou que todos os isolados pertenciam ao gênero *Penicillium*, e que conseguiram isolar do ar e das prateleiras onde os queijos eram colocados, mostrando assim que o crescimento desse gênero, em sua maioria, é ambiental.

Como observado na tabela 1 o gênero *Fusarium* foi outro possível agente micotoxigênico isolado, se tornando um fator preocupante aos consumidores desses queijos informais. Assim como o gênero *Penicillium*, o *Fusarium* é conhecido pela produção de micotoxina, e também por contaminação através do ar. Assim, a presença de fungos do gênero *Fusarium* indica sanitização insatisfatória durante a fabricação do queijo (MASOTTI et al., 2019).

Alguns estudos mostram a baixa presença de *Fusarium* em queijos e que o gênero é associado a problemas em plantações e enfermidades em humanos. Um estudo avaliando a presença de fungos em queijos mostrou que apenas 2,9% dos isolados eram *Fusarium* (TORKAR e VENGUST, 2008).

O presente estudo teve como o segundo maior isolado, mostrando assim que a presença do *Fusarium* é um risco em alimentos. Este gênero é produtor de fumonisinas, que são toxinas produzida por várias espécies, mostrando perigo para a saúde humana (CALDAS et al., 1998). Uma das que mais se destacam é a fumonisina B1, pois ela pode alterar o comportamento e morfologia celular (SAVI; ZENAIDE, 2020).

O gênero *Cladosporium* é marcado pela espécie *Cladosporium cladosporoides* caracterizado principalmente por ser produtor de enzimas que transformam sacarose em frutose, produção da invertase (UMA et al., 2010). Existem estudos que mostram que o gênero *Cladosporium* é um potencial alergênico; a principal causa da contaminação por

*Cladosporium* está no processo de fabricação do queijo. Qualquer falha no processo que permita uma maior acidificação da massa pode predispor o crescimento deste gênero (SOUZA, 2016).

O gênero *Aspergillus* não teve uma alta prevalência neste estudo, porém não é menos importante. Assim como o *Penicillium* e o *Fusarium* a presença desse gênero nesses alimentos é preocupante.

O gênero *Aspergillus* é conhecido por sua alta produção de toxinas. As Aflatoxinas são as micotoxinas mais conhecidas produzidas principalmente pelo *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (RODRIGUES, 2019).

Animais leiteiros que consomem alimentos contendo AFB1 resulta na conversão metabólica da AFB1 em AFM1 (RODRIGUES, 2019). Devido à falta de estudos, a AFM1 foi primeiro categorizada como (grupo 2b) possível carcinógeno humano (SAVI; ZENAIDE, 2020). Porém com o passar dos anos e com base em atividades genotóxicas e carcinogênicas *in vitro*, a AFM1 mudou para o grupo 1 de carcinógeno humano (IARC, 2002; POESTER et. al, 2015; HASSAN et. al, 2018). Assim, a presença dessas toxinas no queijo, provoca sequelas ao consumidor, mostrando, que por mais que tenha se mostrado inferior em quantidade nesse estudo, os consumidores estão expostos a esse agente, que é preocupante.

Em um estudo avaliando 60 amostras de queijos na Eslovênia, observou-se a presença de fungos filamentosos em 60% das amostras, sendo 33,8% do gênero *Aspergillus* (TORKAR e VENGUST, 2008). Outro estudo sobre fungos deteriorantes em queijos observou que 41,3% das ocorrências eram por este agente (NETO, 2005).

Em relação as leveduras, a mais isolada foi a *Kluveromyces lactis* como mostra a Tabela 1, sendo encontrada na maioria das amostras. É uma levedura encontrada comumente em leite e derivados, tem uma alta capacidade de assimilar lactose, como mostra a Tabela 2, e utiliza esse carboidrato como fonte de carbono e energia. Essa atividade permite a realização da fermentação de lactose presente no permeado do soro do leite, um resíduo gerado nos laticínios (HARAMI, 2009). A grande quantidade de amostras contendo *Kluveromyces lactis* pode ser justificada pela fabricação do queijo, com a matéria prima em comum, uma vez que tinham poucos comerciantes e as amostras foram adquiridas do mesmo em um espaço curto de tempo.

A *Candida parapsilosis* e *Clavispora lusitaniae* também conhecida como *Candida lusitaniae* são ditas como *Candida* não-albicans e caracterizadas principalmente por serem patógenos fúngicos oportunistas, sendo emergentes associadas com diversas infecções, tais

como: candidemia, vaginite e endoftalmite, além de ter um crescente surgimento em pacientes hospitalizados (SAVINI et al., 2010). Tem uma taxa de mortalidade menor quando comparada a *Candida albicans* (SILVA et al., 2012). A *C. parapsilosis* é isolada principalmente em fontes ambientais (NOSEK et al., 2009), sendo o fungo mais comumente isolado em mãos humanas (SILVA et al., 2012), podendo justificar assim a presença deste nas amostras analisadas, como contaminação ambiental (SAVINI et al., 2010).

Das amostras analisadas, 70% (14/20) estavam contaminadas com a levedura do gênero *cândida*, sendo que destas 50 % (7/14) eram *C. lusitaniae*; 28,57% (4/14) de *C. parapsilosis*, 7,14% *C. aaseri* e 14,28% (2/14) *C. metapsilosis* mostrando assim o grande perigo do consumo dos queijos vendidos de forma clandestina.

A *Debaryomyces hansenii* é uma espécie comumente encontrada em vários tipos de queijos, além de ser um micro-organismo xerófilo liberam várias proteínas tóxicas que são letais a outras espécies de leveduras competitivas (SAFAA et al.,2017).

**Tabela 2 = Atividade proteolítica, lipolítica e sacarolítica de fungos filamentosos isolados nos queijos tipo Minas Frescal comercializados de forma ilegal em feiras livres de Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019**

Fungos Filamentosos (Gênero)	Amostras	Proteolítico		Lipolítico		Sacarolítico			
		25°C/ 5 dias	7°C/ 10 dias	25°C/ 5 dias	7°C/ 10 dias	Dextrose		Lactose	
						25°C/ 5 dias	7°C/ 10 dias	25°C/ 5 dias	7°C/ 10 dias
<i>Penicillium</i>	1	X <sup>#</sup>	- <sup>*</sup>	X	X	-	-	-	-
<i>Geotrichum</i>		X	-	X	X	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i>	2	-	-	X	-	X	-	X	-
<i>Diplococcium</i>	7	X	-	X	X	X	-	X	-
<i>Fusarium</i>	8	-	X	X	X	-	-	-	-
<i>Penicillium</i>	11	-	-	X	X	-	-	-	-
<i>Fusarium</i>	12	-	X	X	X	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i>		X	X	X	X	-	-	-	-
<i>Fusarium</i>	17	X	X	X	X	-	-	-	-
<i>Penicillium</i>		-	X	X	X	X	X	X	-
<i>Penicillium</i>		X	X	X	X	-	X	-	-
<i>Penicillium</i>		X	-	X	X	-	-	X	-
<i>Penicillium</i>		-	X	-	-	X	X	-	-
<i>Penicillium</i>		-	-	X	-	-	-	-	-
<i>Rhizophus</i>		-	-	X	X	X	-	-	-
<i>Mucor</i>	18	-	-	-	-	X	-	X	-
<i>Penicillium</i>		-	X	X	-	X	-	-	-
<i>Cladosporium</i>		X	X	X	X	-	X	-	-
<i>Penicillium</i>	20	X	-	X	X	-	-	X	-
<b>Total</b>		47 % (9)**	47 % (9)	89,47% (17)	73,68% (14)	36,84% (7)	21,05% (4)	31,57% (6)	

<sup>#</sup> presença, <sup>\*</sup> ausência, <sup>\*\*</sup> porcentagem de fungo positivo para análise (total de amostras positivas para a característica analisada)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação a atividade deteriorante dos fungos filamentosos, 73,68% (14/19) tiveram ação proteolítica, sendo que desses, 21,05% (4/14) obtiveram crescimento em temperatura mesófila e psicrotrófica como mostra a Tabela 2. Dos 19 isolados, 89,47% (17/19) foram lipolíticos, sendo que 82,35 % (14/17) produziram lipases nas duas temperaturas submetidas. e 57,89 (11/19), foram sacarolíticos, sendo destes 72,72% (8/11) sobre a dextrose e 54,54 % (6/11) lactose.

Quanto a atividade lipolítica das leveduras a Tabela 3 mostra que 92% (23/25) utilizam de gorduras como fonte de energia e dessas 86,95% (20/25) produzem lipases em temperatura psicrotrófica. Quanto a atividade proteolítica 64% (16/25) das leveduras obtiveram atividade proteolítica e 37,50% (6/16) desses produziram proteases em temperatura psicrotrófica. Com relação a atividade sacarolítica 88% (23/25) das leveduras tinham esse potencial sobre a dextrose e 12% (3/25) obtiveram energia através da lactose

Leveduras sacarolíticas hidrolisam o carboidrato, produzindo ácido e grande quantidade de gás e álcool (RIBEIRO JÚNIOR, 2015). A dextrose é um açúcar universal compondo diversos alimentos. A maior quantidade de fungos que fermentaram a dextrose indica uma possível contaminação ambiental sobre o queijo, assim, o potencial sacarolítico desses microrganismos podem degradar outros alimentos.

O ponto alto do metabolismo de qualquer carboidrato é a sua degradação em glicose, que é o carboidrato mais simples; no queijo o único carboidrato é a lactose; então agentes que apresentem enzimas galactosidase se sobressai nesse meio, eles clivam a lactose em glicose (BELOTI, 2015). O ácido láctico é o metabólito principal produzido por esses micro-organismos e é a principal causa de acidificação; a maioria das enzimas que degradam o carboidrato tem a temperatura mesófila como ótima para sua ação, ou seja, a refrigeração de queijos pode diminuir a atividade destas enzimas (BELOTI, 2015).

Ribeiro Júnior et al., (2017), avaliando os isolados identificados de fungos termofílicos proteolíticos do leite cru refrigerado, observou que das 08 amostras que obtiveram crescimento fúngico, 9,1% (1/11) das colônias cresceram apenas em temperatura mesófila e 90,9% (10/11) em temperatura psicrotrófica.

**Tabela 3 - Atividade proteolítica, lipolítica e sacarolítica de fungos leveduriformes isolados nos queijos tipo Minas Frescal comercializados de forma ilegal em feiras livres de Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019**

Fungos Leveduriformes	Amostras	Proteolítico		Lipolítico		Sacarolítico			
		25°C/ 5 dias	7°C/ 10 dias	25°C/ 5 dias	7°C/ 10 dias	Dextrose		Lactose	
						25°C/ 5 dias	7°C/ 10 dias	25°C/ 5 dias	7°C/ 10 dias
<i>Candida parapsilosis</i>	1	-*	-	X <sup>#</sup>	X	X	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	2	X	-	X	X	X	-	-	-
<i>Kluveromyces lactis</i>	3	X	-	X	X	X	X	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	4	X	-	X	X	-	-	-	-
<i>K. lactis</i>	6	X	X	X	X	X	X	X	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	7	-	-	-	-	X	-	-	-
<i>K. lactis</i>	8	-	-	X	X	X	-	-	-
<i>K. lactis</i>	9	-	-	X	X	X	-	-	-
<i>K. lactis</i>	10	X	-	X	-	X	-	-	-
<i>Candida metapsilosis</i>	11	-	-	X	X	X	-	-	-
<i>Clavispora lusitaniae</i>		X	X	X	X	X	X	-	-
<i>Candida spp.</i>		-	-	X	X	X	X	-	-
<i>K. lactis</i>	12	-	-	X	X	X	X	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	13	X	X	X	X	X	-	-	-
<i>K. lactis</i>		X	-	X	X	X	-	-	-
<i>K. lactis</i>	14	X	-	-	-	X	-	X	-
<i>C. parapsilosis</i>		X	-	X	X	X	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	15	X	-	X	-	X	-	-	-
<i>C. metapsilosis</i>	16	-	-	X	X	X	X	-	-
<i>K. lactis</i>		X	-	X	X	X	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>		-	-	X	X	-	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	17	X	X	X	X	X	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	18	X	X	X		X	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	19	X	-	X	X	-	-	-	-
<i>Candida aaseri</i>	20	X	X	X	X	X	-	X	-
<b>TOTAL</b>		64% (16)**	24% (6)	92% (23)	80% (20)	88% (22)	24% (6)	12% (3)	0% (0)

\*ausência, #presença, \*\*porcentagem de fungo positivo para análise (total de amostras positivas para a característica analisada)

Fonte: Elaborada pelo autor

Outro estudo mostrando a contaminação do leite na ordenha por micro-organismos proteolíticos e lipolíticos observou que 44,14% (64/145) das amostras possuíam microrganismos lipolíticos e apenas 11,03% (16/145) possuíam atividade proteolítica (MOREIRA e MONTANHINI, 2014). Esses resultados corroboram com os achados no presente estudo, onde a maioria dos isolados obteve atividade lipolítica. A presença desses microrganismos traz problemas tecnológicos, diminuindo a vida útil do queijo e fazendo alterações em seu sabor, tornando o produto mais ranço, com sabor amargo e um forte odor.

A presença tanto dos fungos filamentosos quanto leveduriformes é preocupante, pois são produtores de enzimas deteriorantes que diminuem a vida útil do alimento, e dependendo do gênero e espécie, além de ser deteriorantes, podem ser produtores de toxinas (LACAZ et al., 2002).

## 6 CONCLUSÃO

Evidenciou-se nesse estudo a presença de fungos filamentosos e leveduriformes em queijos Minas Frescal comercializados clandestinamente em feiras livres no município de Araguaína/TO. Grande parte dos filamentosos isolados é do gênero *Penicillium*, um produtor de toxinas que se ingeridas podem causar graves problemas à saúde humana inclusive relacionados a neoplasias. As leveduras de maior prevalência foi a *Kluveromyces lactis* seguida da *Clavispora lusitaniae*.

A alta contagem de fungos filamentosos e leveduras nas amostras indicam a falta de higiene na matéria prima, como na produção, armazenamento e comercialização deste produto.

Os fungos isolados tem um alto potencial deteriorante diminuído a qualidade e a vida útil do alimento que estes estão presentes.

É necessário que lideranças públicas promovam investimentos que favoreçam a educação sanitária. Eventos de extensão de conhecimentos devem ser aplicados e a fiscalização sanitária deve ser intensificada para que não haja transporte e comercialização destes produtos.

Políticas públicas devem ser implantadas com o objetivo de auxiliar o pequeno produtor, tanto na capacitação deste como na fabricação do seu produto.

## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCECELL, M. I.C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública **Archives of Veterinary Science** v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. Microbiologia de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1997. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Control of Communicable Diseases Manual**. Abram. S. Benenson, Ed., 16 th Edition, 1995, p. 57-59 e 325-326.

ALSHANNAQ, A., & YU, J. H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 14(6), 632. 2017. doi: 10.3390/ijerph14060632

ALMEIDA, Aliny Costa. CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE QUEIJOS DE COALHO. **Dissertação** (Mestrado em Biologia de Fungos) Universidade Federal do Pernambuco. Recife. 2011.

AMIOT, . Ciencia y tecnologia de la leche – Principios e aplicaciones. Zaragoza: Acribia, 1991.

AMORIM, A. L. B. C.; COUTO E.P.; SANTANA, A.P.; RIBEIRO, J.L.; FERREIRA, M.A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 364-367, 2014.

ANDRADE, A. C. Estudo da fermentação simultânea à hidrólise de soro de queijo utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química), UFU, Uberlândia-MG, 97f., 2005.

ANDRADE, R. P.; MELO, C. N.; GENISHEVA, Z.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food research international**, v. 91, p. 72-79, 2017.

EMBRAPA GADO DE LEITE. 2018. Disponível: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36560390/anuario-do-leite-2018-e-lancado-na-agroleite> Acesso em: 01 set. 2019.

ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e identificação dos fungos de importância médica. 2004. Disponível: [https://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](https://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_7_2004.pdf) > Acesso 08/08/2020

ARAGÃO, Michele de Oliveira Paiva. Diversidade de Fungos Filamentosos e Leveduras em Queijo Minas Artesanal das Microrregiões do Serro e Serra da Canastra. **Dissertação** (Mestrado em Ciência dos Alimentos – Área de concentração: Micologia de Alimentos) Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2018

ARAÚJO, W. N.; SILVEIRA, V. F.; SILVA, M. H.; MARTINEZ, T. C. N. Isolamento e identificação de coliformes no queijo Minas comercializado na região metropolitana de

Salvador / Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e produção Animal**. Bahia, n.2, p. 3-42, 2001

BANJARA N.; SUHR M.J.; HEATHER E.; HALLEN A. Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types . **Current Microbiology** 70:792–800 DOI 10.1007/s00284-015-0790-1. 2015

BERESFORD, T.P., FITZSIMON, N.A., BRENNAN, N.L., COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. 2001. **International Dairy Journal**, v.11, p. 259-274

BELOTI, Vanerli. **Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade: Micro-organismos de Importância no Leite**. 1.ed. Londrina: Planta, 2015, 116p.

BLAKISTON. **Dicionário Médico**. 2. ed. São Paulo; Organização Andrei Editora LTDA, 1982. 1169p.

BRASIL- MINISTERIO DA SAUDE. GUIA ALIMENTAR PARA A POPULAÇÃO BRASILEIRA. 2008, DIPONIVEL  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_alimentar\\_populacao\\_brasileira\\_2008.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2008.pdf).  
ACESSO: 25/11/2020.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, DF. Disponível em:  
<<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>>. Acesso em: 19 jul. 2019.

BRASIL, Leis, decretos, etc. Portaria nº 352/97 do Ministério da Agricultura e do abastecimento. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. 1997. Acesso em 10. Nov. 2019.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, DF. Disponível em:  
<<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>>. Acesso em: 19 jul. 2019.

BOUTROU, R., GUÉGUEN, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International Journal of Food Microbiology** 102, 1-20, 2005.

BUDAK, S. O.; FIGGE, M. J.; HOUBRAKEN, J.; VIRIES, R. P. The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 58, p. 50-53, 2016.

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

- BUTINAR, L., SANTOS, S., SPENCER- MARTINS, I., OREN, A., GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. 2005. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 229- 234.
- CALDAS, L. S.; PADMAJA, H.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 87-132
- CALLON, C.; DUTHOIT, F.; DELBES, C.; FERRAND, M.; FRILEUX, Y. L.; CREMOUX, R.; MONTEL, M. C. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. **Systematic and applied microbiology**, v. 30, n. 7, p. 547-560, 2007.
- CARDOSO, V.; BORELLI, B. M.; LARA, C. A.; SOARES, M.A.; PATARO, C.; BODEVAN, E. C.; ROSA, C. A. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69, p. 331-340, 2015.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, May 1939.
- CHAVEZ, R.; BULL, P; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.123, p. 413-433, 2006.
- CHENG, H.R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnol Lett**, 28 (1):55–59. 2006
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2016. Disponível em : [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia\\_de\\_alimentos/arvore](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore)> acesso em : 03/11/2020
- ESCRIVÁ, L., FONT, G., & MANYES, L. (2015). In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. **Food and Chemical Toxicology**, 78, 185-206. doi: 10.1016/j.fct.2015.02.005
- EZEKIEL, C.N.; UDOM, I.E.; FRISVAD, J.C.; ADETUNJI, M.C.; HOUBRAKEN, J.; FAPOHUNDA, S.O.; SAMSON, R.A.; ATANDA, O.O.; AGI-OTTO, M.C.; ONASHILE, O.A.; Avaliação de *Aspergillus* aflatoxigênico e outros fungos em milho e gergelim do Estado de Plateau, Nigéria. **Micologia**. Março de 2014; 5 (1): 16-22. doi: 10.1080 / 21501203.2014.889769. Epub 2014, 25 de março. PMID: 24772370; PMCID: PMC3979445.
- FAIA, Ana Margarida. 2011. Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água. **Dissertação** (Mestrado em biologia celular e biotecnologia). Universidade de Lisboa. Departamento de Biologia Vegetal
- FILTENBORG, O.; FRISVAD. J. C.; THIRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**. N. 33, p. 85-102, 1996

FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no estado da Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, jan./fev., 1999.

FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavour. 2003. **International Journal of Food Microbiology**, V. 86,I. 1-2.

GADAGA T.; MUTUKUMIRA A.; NARVHUS J. Enumeration and identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. **International Dairy Journal** 10:459–466. 2000.

GEKAS, V. & LOPEZ-LEIVA, M., (1985). Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, 20, 2-12.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41:95-98

HARAMI, Talita. Influencia de K/Rox1p no metabolismo fermentativo de *Kluyveromyces lactis*. 2009. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa- Minas Gerais

HASSAN, Z.U.; AL-THANI, R.; ATIA, F.A.; ALMEER, S.; BALMAS, V.; MIGHELI, Q. JAOUA, S. Evidence of low levels of aflatoxin M1 in milk and dairy products marketed in Qatar. **Food Control**. 92. 2018.

HUANG, X. and A. Madan. 1999. CAP3: ADNA sequence assembly program. *Genome Research*. 9:868-877. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.9.9.868>

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. v. 43, 2016. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados> Acesso em: 20 ago. 2020.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology** (6<sup>th</sup> ed.) New York: Chapman and Hall, pp. 701, 2000

JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeast. 2008. **International Journal of Microbiology**, v. 126, p.321-326

KURE, C. F.; ALBELN, E. C. A.; HOLST-JENSEN, A.; SKAAR, I. Differentiation of *Penicillium commune* and *Penicillium palitans* isolates from cheese and indoor environments of cheese factories using M13 fingerprinting. **Food Microbiology**, v. 19, n. 2-3, p. 151-157, Apr. 2002.

LAVOIE, K.; TOUCHETTE, M.; ST-GELAIS, D.; LABRIE, S. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. **Dairy science & technology**, 92(5), 455-468, 2012.

LUO, Y., LIU, X., & LI, J. (2018). Updating techniques on controlling mycotoxins - A review . **Food Control**, 89, 123-132. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.01.016

MASOTTI, F.; VALLONE, L.; RANZINI S.; SILVETTI T.; MORANDI S.; BRASCA M. Effectiveness of air disinfection by ozonation or hydrogen peroxide aerosolization in dairy environments. **Food Control**, v. 97, p. 32-38, 2019

MARIOTO, L.R.M.; DANIEL, G.C.; GONZAGA, N.; MAREZE, J.; TAMANINI, R. BELOTI, V. Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrófica, termodúrica e esporulada do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**. Vol 21. 2020

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

MEDEIROS M. I. M.; FILHO, A. N.; SOUZA, V.; MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; CANALEJO, L. M. M. Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* na produção de queijo Minas Frescal **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.14, n.1, p. 98-105, jan./mar. 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Brasília. BRASIL, 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (**RIISPOA**)

MOREIRA N. V., MONTANHINI M. T. M. Contaminação do leite na ordenha por microorganismos proteolíticos e lipolíticos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. 2014;8(2):29-38.

NETO, J. S. C. Bolores deteriorantes em queijo parmesão. 65 p. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2005.

NOSEK, J.; HOLESOVA, Z.; KOSA, P.; ATTILA; GACSER, A.; TOMASKA, L. 2009. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**. 55:497–509

OGUNADE, I. M.; K. G. ARRIOLA, Y.; JIANG, J. P.; DRIVER, C. R.; STAPLES, A. T.; ADESOGAN. 2016. Effects of 3 sequestering agents on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune status of dairy cows fed diets artificially contaminated with aflatoxin B1. **Journal of Dairy Science**. 99:6263–6273.

OLIVEIRA, da Silva Monike. Perigos microbiológicos e qualidade higiênico-Sanitária de queijos Minas Frescal informais comercializados no norte do Tocantins. 2020. **Dissertação** (Mestrado em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trótipos), Universidade Federal do Tocantins.

PASSOS, A. D.; FERREIRA, G. K. L.; JULIANI, G. L.; SANTANA, E. H. W.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR. **Ver Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 369, p. 48-54, 2009.

PITT, J. I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: **Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC**, 2000. 197 p.

PIZZIRANI KLEINER, A. A.; PEREIRA, J O; AZEVEDO, J. L. **Genética de fungos no laboratório**. [S.l: s.n.], 1998.

POESTER, V. R.; KLAFKE, G. B.; CABANA, A.L.; ADORNES, A.C.; FILHO, R.P.S.; XAVIER, M.O. Isolamento e identificação de fungos do gênero *Aspergillus* spp. de água utilizada na reabilitação de pinguins-demagalhões. **Ciencia Animal. Brasileira.**, Goiânia, v.16, n.4, p. 567-573 out./dez. 2015

PROBST, C.; NJAPAU, H. PETER, J. C. Outbreak of an Acute Aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the Causal Agent. **Applied and environmental microbiology**, Apr. 2007, p. 2762–2764. doi:10.1128/AEM.02370-06

QUINTANA, RC; CARNEIRO, LC. Evaluation of hygienic-sanitary conditions of the minas frescal and mozzarella cheese produced in Morrinhos city -GO. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Bahia, v.8, n.3, p.205-211, 2007. Disponível em: . Acesso em: 10 set 2015.

QUEIROZ, O. C. M., J. H. HAN, C. R. STAPLES, A. T. ADESOGAN. 2012. Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B1-contaminated diet. **Journal of Dairy Science**. 95:5901–5908

RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptides produced by action of psychrotrophic protease on ksein. **Journal of Dairy Research** 67, 625-630, 2000.

RIBEIRO, E. S. S., NASCIMENTO, A. F., SILVA, L. D., LIRA, N. A., PASSAMANI, F. R. F., BATISTA, L. R., & MATTEOLI, F. P. (2020). Occurrence of filamentous fungi isolated from matured blue cheese. **Brazilian Journal of Food Technology**, 23, e2019074. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.07419>

RIBEIRO JÚNIOR, José Carlos. Isolamento e identificação da microbiota esporulada e fúngica associada à deterioração o leite. 2015. 77 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal – Área de concentração: Sanidade Animal) Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; BELOTI, V.; MASSI, F.P.; FUNGARO, M. H. P. Thermotolerant psychrotrophic proteolytic microbiota from refrigerated raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 38, núm. 1, enero-febrero, 2017, pp. 267-271 Universidade Estadual de Londrina Londrina, Brasil.

RIBEIRO JÚNIOR, J.C.; SANTOS, I.G.C; DIAS, B.P.; MENDES, L.P.; BARBON, A.P.A.C. Perfil do consumidor brasileiro e hábitos de consumo de leite e derivados. **Archives of veterinary science**. V.25, n.2. 2020

RIDDELL, R.W. 1950. Pemanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **MyCOLOGIA** 42:265-270.

RODRIGUES R.O.; RODRIGUES D. R.; LEDOUX G. E.; ROTTINGHAUS R.; BORUTOVA O.AVERKIEVA; MCFADDEN T.B. Feed additives containing sequestrant clay minerals and inactivated yeast reduce aflatoxin excretion in milk of dairy cows. **Journal of Dairy Science** 2019

SÁ, S. A. C. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. P.; DORES, M. T.; VISÔTO, L E.; SILVA, C. R. Avaliação das condições de aeração do pré-inóculo utilizado no cultivo de bactérias ácido lácticas (BAL) em meio líquido. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 6, p. 0841-0845, 2017

SAFAA, A. A.; HALA, A.; ZAID, T. A.; WHIJDAN, H.A.A.; AL-KUBAISY, J.A.A.I. “Produção, Caracterização e antimicrobiana e Atividade antimicrobiana e Atividade de Mycocin produzido por *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238”. **Internacional Journal of Microbiology**, vol. 2017. DOI 10.1155/2017/2605382

SAVI, G.D.; ZENAIDE, F. D. S., Micotoxinas: riscos à saúde humana pela ingestão diária de alimentos contaminados e sua ocorrência em amostras clínicas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, e24942482, 2020 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i4.2482>

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; ONOFRILLO, D.; MASCIARELL, I G.; ASTOLFI, D.; BALBINOT, A., FEBBO, F.; D'AMARIO, C.; D'ANTONIO, D. 2010. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. **Mycoses**. 54:434–441.

SILVA, Juliana Victorino. Qualidade Microbiologica e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijo tipo “Minas Frescal”. **Dissertação** ( Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Estadual Paulista “ Julio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, 2003

SILVA, C.C. Avaliação do uso de leveduras ( *Saccharomyces cerevisiae*) inativas e hidrolizadas nas dietas iniciais de leitões. 2009. **Dissertação** (Mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga, São Paulo.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R.A.R; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água (livro eletrônico)**, 5. Ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, DW.; AZEREDO, J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Revista de Microbiologia**. 36:288– 305.

SOUZA, C. D. O., MELO, T. R. B., MELO, C. D. S. B., MENEZES, Ê. M., CARVALHO, A. C. D., & MONTEIRO, L. C. R. (2016). *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreioagênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. 7(2), 79-91.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a -20 °C. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n2 z, p. 73-74, 2008.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos – ocorrência e detecção. Campinas: **ITAL/Núcleo de Microbiologia**, 2001. 82p.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite** (3ª ed.) Santa Maria : UFSM, 206 PP., 2008

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C.L. **Microbiology: an introduction Yorkshire: Pearson**, 975 pp., 2013

TORKAR, K. G.; VENGUST, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. **Food Control**, v. 19, n. 5, p. 570-577, 2008.

UMA, C.; GOMATHI, D.; MUTHULAKSHMI, C.; GOPALAKRISHNAN, V.K. Production, purification and characterization of invertase by *Aspergillus flavus* using fruit peel waste as substrate. **Advances in Biological Research** 4, 31–36, 2010.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, . P. Leche y productos lácteos, Tecnología, Química y Microbiología. Zaragoza: Acribia, 1995

WANDERLEY L.; ARRUDA T.; MENEGHELLO A. Occurrence and pathogenicity of *Candida* spp. in unpasteurized cheese. **Brazilian Journal Bioscience** ,2013, 11:145–148.

## APÊNDICE

Figura 6 – Dendrograma de similaridade filogenética de fungos leveduriformes isolados de amostras de queijo Minas Frescal clandestino.

