



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

MICHELLE DE MEDEIROS CARVALHO

**AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS METABÓLITOS E DA SEGURANÇA DE  
CONSUMO DE QUEIJOS BRASILEIROS MATURADOS NA PRESENÇA DE  
ÁCAROS (ACARI: ACARIDAE)**

Florianópolis

2023

MICHELLE DE MEDEIROS CARVALHO

**AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS METABÓLITOS E DA SEGURANÇA DE  
CONSUMO DE QUEIJOS BRASILEIROS MATURADOS NA PRESENÇA DE  
ÁCAROS (ACARI: ACARIDAE)**

Tese de Doutorado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner  
Coorientadora: Profa. Dra. Norma M. da Silva

Florianópolis

2023

Carvalho, Michelle de Medeiros  
AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS METABÓLITOS E DA SEGURANÇA DE  
CONSUMO DE QUEIJOS BRASILEIROS MATURADOS NA PRESENÇA DE  
ÁCAROS (ACARI: ACARIDAE) / Michelle de Medeiros Carvalho ;  
orientador, Juliano De Dea Lindner, coorientadora, Norma  
Machado Silva, 2023.

86 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Queijos Maturados . 3.  
Ácaros . I. Lindner, Juliano De Dea. II. Silva, Norma  
Machado. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV.  
Título.

MICHELLE DE MEDEIROS CARVALHO

**AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS METABÓLITOS E DA SEGURANÇA DE CONSUMO DE  
QUEIJOS BRASILEIROS MATURADOS NA PRESENÇA DE ÁCAROS (ACARI:  
ACARIDAE)**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr Adenir Vieira Teodoro  
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Prof. Dr. Carlos Peres Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Carlos José de Carvalho Pinto  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra Silvani Verruk  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Ciência dos alimentos.

Coordenação do Programa de Pós Graduação

Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner - Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023

Dedico este trabalho a Ivalcir e Laura.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Juliano e às professoras Célia e Norma por todo o apoio e companheirismo;

A todos pesquisadores das diversas instituições que participaram dessa rica jornada interdisciplinar de forma direta ou indireta;

À Fapesc e à UFSC pela viabilização da realização deste estudo;

Aos produtores, maturadores e amigos do queijo que de alguma maneira contribuíram para a efetivação deste trabalho.

Em 1903 um filme sobre a presença dos ácaros em queijos se tornou um verdadeiro sucesso. No curta metragem inglês, de aproximadamente 2 minutos, um pesquisador degustava seu queijo *Stilton* e, de repente, apanha uma lupa e observa em seu queijo milhares de ácaros. As imagens dos ácaros se movimentando sobre o queijo surpreenderam e fascinaram o público. A indústria de laticínios, com receio do filme causar rejeição e inibir o consumo do queijo *Stilton*, engendrou uma forma de censurar o filme mas, recentemente, este filme foi resgatado e divulgado em plataformas de vídeos, se tornando acessível novamente, só que agora de forma globalizada. De lá pra cá, não só o filme foi censurado, quanto os estudos acerca do tema também foram negligenciados. A partir do início da maturação intencional de queijos com ácaros no Brasil, pesquisadores brasileiros se debruçaram sobre o tema realizando esta pesquisa pioneira mundialmente. Finalmente chegou o momento de discutirmos sobre os ácaros do queijo!

Fonte: <https://www.mentalfloss.com/article/20570/cheese-mites-how-cheese-eating-pests-became-cinematic-stars> acessado em 03/03/23 às 16:00

## RESUMO

A maturação é uma etapa da produção de queijos onde reações físicas, químicas e microbiológicas acontecem, designando ao produto final uma característica sensorial e reológica específica. Durante a maturação, pode acontecer processos inesperados, tal como a presença de ácaros. Os ácaros estão presentes naturalmente no ambiente de maturação e, quando micófagos, são atraídos pelos fungos que se encontram nos queijos, se alojam na superfície dos mesmos consumindo estes fungos e posteriormente o próprio queijo. A maturação de queijos na presença de ácaros é uma técnica conhecida e regulamentada em países do continente europeu, como no caso do queijo francês *Mimolette* e do alemão *Milbenkäse*. No entanto, estudos mais aprofundados sobre o real efeito desses ácaros como coadjuvantes tecnológicos e da segurança de consumo deste tipo de produto ainda não foram conduzidos. No Brasil, a prática de utilização intencional de ácaros durante a maturação é ainda inicial e era desconhecida do ponto de vista científico até então. Neste trabalho foram realizadas avaliações quimiométricas dos compostos orgânicos voláteis (COV) e metabólitos em dois tipos de queijos brasileiros maturados na presença e ausência de ácaros, utilizando espectrometria de massa por cromatografia gasosa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Foi avaliada a segurança de consumo desses queijos *in vivo* utilizando camundongos não imunossuprimidos e imunossuprimidos por doses de ciclofosfamida (CY) e, através de análise metataxonômica, foi investigada a relação entre a microbiota presente no intestino dos ácaros e a microbiota presente no queijo, tanto na superfície (casca) quanto na região central (meio). A maturação de queijos na presença de ácaros induziu a produção de metabólitos e COV que conferiram identidades sensoriais desejáveis nas superfícies desses produtos. Entretanto, nenhuma influência dos ácaros foi observada no meio do queijo. Os dados demonstraram que camundongos não imunossuprimidos (não tratados com CY) mantiveram as características de indivíduos não imunossuprimidos quando alimentados com queijos maturados na presença ou ausência de ácaros durante 13 dias, enquanto que foi observada a reversão da imunossupressão de camundongos imunossuprimidos (tratados com CY) após o consumo destes queijos (casca e meio). Ainda, a dieta proporcionou incremento de peso corporal em todos os grupos avaliados. Foram identificadas duas unidades taxonômicas operacionais (UTOs) compartilhadas entre a microbiota dos ácaros e da casca do queijo (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* e *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*) e duas UTOs compartilhadas entre a microbiota dos ácaros e o meio do queijo (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* e *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*). Os resultados demonstraram que os ácaros podem contribuir com atributos sensoriais desejáveis nos queijos, que o consumo de queijos com ácaros se mostrou seguro em camundongos e que a microbiota compartilhada entre ácaros e queijo é inócua. Este estudo pode suportar o avanço da regularização da maturação de queijos na presença de ácaros em países que ainda não possuem este tipo de legislação, como é o caso do Brasil.

**Palavras-chave:** ácaros do queijo; queijo *Mimolette*; queijo *Milbenkäse*.



## ABSTRACT

Ripening is a stage in cheese production where physical, chemical, and microbiological reactions occur, giving the final product a specific sensory and rheological characteristic. During ripening, unexpected processes can occur, such as the presence of mites. Mites are naturally present in the ripening environment and, when they are mycophages, they are attracted to the fungi found on the cheese, lodge on the surface consuming these fungi present and later the cheese itself. The ripening of cheese in the presence of mite is a technique known and regulated in countries on the European continent, as in the case of the French cheese Mimolette and the German Milbenkäse. However, further studies on the real effect of these mites as technological adjuvant and the safety of consumption of this type of product have not yet been conducted. In Brazil, the intentional use of mites during ripening is still initial and was unknown from a scientific point of view until now. In this work, chemometric evaluations of volatile organic compounds (VOC) and metabolites were carried out in two types of Brazilian cheeses ripened in the presence and absence of mites, using gas chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The safety of consumption of these cheeses *in vivo* was evaluated using non-immunosuppressed and immunosuppressed mice by doses of cyclophosphamide (CY) and metataxonomic analysis. The relationship between the microbiota present in the mites' intestine and the microbiota present in the cheese was investigated, both on the surface and in the central region. The ripening of cheeses in the presence of mites induced the production of metabolites and VOCs that conferred desirable sensory identities on these products' surfaces (rind). However, no mite influence was observed in the inner part of the cheese. The data showed that non-immunosuppressed mice (not treated with CY) maintained the characteristics of non-immunosuppressed individuals when fed with cheeses ripened in the presence or absence of mites for 13 days, while reversal of immunosuppression was observed in immunosuppressed mice (treated with CY) after consumption of these cheeses (rind and inner part). Furthermore, the diet increased body weight in all groups evaluated. Two operational taxonomic units (OTUs) shared between the mites and cheese rind microbiota (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* and *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*), and two OTUs shared between the mites microbiota and the inner cheese part (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* and *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*). The results demonstrated that mites can contribute to desirable sensory attributes in cheese, that consumption of cheese with mites was safe in mice, and that the microbiota shared between mites and cheese is harmless. This study may support the advancement of regularization of cheese maturation in the presence of mites in countries that do not yet have this type of legislation, such as Brazil.

**Keywords:** cheese mites; *Mimolette* cheese; *Milbenkäse* cheese.

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>13</b> |
| <b>3</b> | <b>AVALIAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DE METABÓLITOS E COMPOSTOS VOLÁTEIS DE QUEIJOS MATURADOS COM ÁCAROS .....</b>                         | <b>19</b> |
| 3.1      | INTRODUÇÃO .....   | 19        |
| 3.2      | MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 20        |
| 3.2.1    | <i>Fabricação e maturação dos queijos</i> .....  | 20        |
| 3.2.2    | Identificação das espécies de ácaros presentes nos queijos .....   | 21        |
| 3.2.3    | Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) .....  | 22        |
| 3.2.4    | Análise de quimiometria por conjunto de dados <sup>1</sup> H RMN .....   | 23        |
| 3.2.5    | Cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS).....  | 24        |
| 3.2.6    | Análises de quimiometria por CG-MS <i>dataset</i> .....  | 25        |
| 3.3      | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 25        |
| 3.3.1    | Identificação das espécies de ácaros do queijo .....   | 25        |
| 3.3.2    | Variação dos metabólitos na produção de queijos maturados com e sem ácaros.....  | 27        |
| 3.3.3    | .....  | 29        |
| 3.3.4    | Variação dos compostos orgânicos voláteis durante a produção de queijos maturados com e sem ácaros .....                         | 33        |
| 3.4      | CONCLUSÕES .....   | 40        |
| <b>4</b> | <b>DETERMINAÇÃO DA SEGURANÇA DO CONSUMO DE QUEIJOS MATURADOS COM ÁCAROS USANDO CAMUNDONGO SWISS: UMA PROVA DE CONCEITO .....</b> | <b>41</b> |
| 4.1      | INTRODUÇÃO .....   | 41        |
| 4.2      | MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 42        |
| 4.2.1    | Maturação dos queijos e identificação das espécies de ácaros.....  | 42        |
| 4.2.2    | Exigências éticas/legais e uso de animais em experimentos .....  | 42        |
| 4.2.3    | Planejamento experimental.....   | 44        |
| 4.2.4    | Hemograma e análises bioquímicas, parâmetros zootécnicos, clínicos, morfológicos.....  | 44        |
| 4.2.5    | Análises dos resultados .....  | 45        |
| 4.3      | RESULTADOS.....  | 45        |

|       |   |           |
|-------|---|-----------|
| 4.3.1 | Maturação dos queijos e identificação das espécies de ácaros.....   | 45        |
| 4.3.2 | Consumo de alimento e ganho de peso .....   | 46        |
| 4.3.3 | Parâmetros zootécnicos, hemograma, análises bioquímicas e análises morfológicas de fígados de camundongos não tratados com CY (não imunossuprimidos)..... | 49        |
| 4.3.4 | Parâmetros zootécnicos, hemograma, análises bioquímicas e morfológicas de fígados de camundongos tratados com CY (imunossuprimidos).....                  | 53        |
| 4.4   | DISCUSSÃO .....   | 55        |
| 4.5   | CONCLUSÃO .....   | 57        |
| 5     | <b>AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA MICROBIOTA DOS ÁCAROS PRESENTES NA MATURAÇÃO DE QUEIJOS COM A MICROBIOTA DO PRODUTO FINAL.....</b>                           | <b>58</b> |
| 5.1   | INTRODUÇÃO.....   | 58        |
| 5.2   | MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 59        |
| 5.2.1 | Maturação de queijos com ácaros e identificação das espécies de ácaros presentes).....  | 59        |
| 5.2.2 | Extração de DNA da microbiota bacteriana dos queijos maturados....  | 59        |
| 5.2.3 | Extração de DNA da microbiota bacteriana presente no sistema digestório dos ácaros .....  | 60        |
| 5.2.4 | Amplificação do RNA ribossomal 16S, construção da biblioteca e sequenciamento .....   | 60        |
| 5.2.5 | Análises metataxonômicas .....  | 61        |
| 5.2.6 | Análise da diversidade microbiana .....   | 62        |
| 5.2.7 | Análises estatísticas.....  | 62        |
| 5.3   | RESULTADOS.....   | 63        |
| 5.4   | DISCUSSÃO .....   | 72        |
| 5.5   | CONCLUSÃO .....   | 73        |
| 6     | <b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>  | <b>74</b> |
| 7     | <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>76</b> |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Durante a maturação de queijos é recorrente o acontecimento de processos inesperados (ou esperados) em decorrência das sucessões de microrganismos presentes em cada etapa da maturação. Um desses acontecimentos é a presença de um pó fino próximo ao produto e em sua superfície. Este pó, semelhante ao “pó de cupim”, é constituído de ácaros vivos e mortos, restos de queijo e excrementos dos ácaros, e caracteriza a presença dos ácaros infestando o queijo. Estes ácaros, presentes no ambiente de estocagem de alimentos, são conhecidos como ácaros de estocagem e podem infestar variados tipos de produtos alimentícios (CARVALHO *et al.*, 2018a).

Apesar da presença de ácaros em queijos ser considerada um problema tecnológico durante a maturação, existem queijos cuja esta presença é desejável para a obtenção das características peculiares do produto final, como é o caso dos queijos francês Mimolette e alemão Milbenkäse, caracterizados pela infestação de ácaros das espécies *Acarus siro* e *Tyrophagus casei*, respectivamente (MELNYK *et al.*, 2010).

Após o conhecimento destes queijos europeus, produtores brasileiros de queijo artesanal passaram a elaborar queijos maturados com ácaros intencionalmente, mesmo existindo no Brasil legislação que proíba este tipo de processo (BRASIL, 2014), ao contrário da legislação da União Europeia que autoriza esta tecnologia (EUROPE, 2002).

Ao localizar estes produtores, Carvalho *et al.* (2018b) identificaram, através de análises taxonômicas e moleculares, os ácaros presentes nos diferentes queijos maturados com ácaros provenientes de 3 (três) estados brasileiros (Minas Gerais, Santa Catarina e São Paulo) perfazendo um total de 12 amostras. Constatou-se que os ácaros presentes nos queijos brasileiros diferem dos ácaros presentes nos queijos de outros países identificados na literatura como coadjuvantes tecnológicos de fabricação (CARVALHO *et al.*, 2018b), sendo que uma das espécies identificadas, *Sancassania aff. feytaudi*, ainda não tinha sido relatada em queijos

Com estas informações, vislumbrou-se a necessidade de produção de conhecimento sobre estes ácaros presentes em queijos brasileiros com o intuito de avaliar o potencial efeito tecnológico e risco de consumo destas

espécies e contribuir para a regulamentação deste tipo de processo tecnológico que vem sendo introduzido no Brasil.

Neste contexto, a proposta desta tese foi entender o efeito tecnológico da presença dos ácaros neotropicais durante a maturação de queijos, bem como a segurança de consumo deste produto. O trabalho foi dividido em quatro seções que serão apresentadas a seguir. A primeira seção faz um breve histórico do estado da arte sobre queijos maturados com ácaros; na segunda seção investigou-se o efeito dos ácaros no produto final por meio de análises quimiométricas dos compostos orgânicos voláteis (COV) e metabólitos em dois tipos de queijos brasileiros curados na presença, utilizando espectrometria de massa por cromatografia gasosa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear; na terceira seção avaliou-se a segurança de consumo dos queijos maturados com ácaros utilizando camundongos não imunossuprimidos e imunossuprimidos por doses de ciclofosfamida (CY); e a quarta seção verificou-se a relação entre a microbiota presente no intestino dos ácaros e a microbiota presente no queijo, tanto na superfície (casca) quanto na região central (meio) através de análises metataxonômicas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os queijos artesanais brasileiros são tradicionalmente produzidos a partir de leite cru e possuem tempo de maturação inferior a 60 dias (CARVALHO *et al.*, 2019). Em virtude dessas características, estes queijos passaram por um longo período de dificuldades para conseguir serem legalizados no território nacional (BRASIL, 2019).

Para chegar ao estabelecimento de uma legislação que atendesse as necessidades dos queijos de leite cru, produtores brasileiros realizaram uma intensa troca de experiências com produções estabelecidas e legalizadas no continente europeu. Nessa troca de experiências identificaram produtos que, até então para os produtores brasileiros se tratava de um alimento com características defeituosas, mas que, eram legalizados (FRANCE, 2017). e extremamente apreciados por produtores e consumidores europeus. Dentre esses produtos destacam-se os queijos maturados na presença de ácaros (CARVALHO *et al.*, 2018a).

Os ácaros são organismos pertencentes ao Filo Artrópoda e possuem algumas características comuns aos insetos como a presença de exoesqueleto quitinoso e pernas articuladas (FLECHTMANN, 1986). Estão presentes naturalmente em diversos ambientes incluindo os ambientes de maturação de queijo. Os ácaros, quando micófagos, possuem os fungos como sua principal fonte de alimentação e, por essa razão, são atraídos pelos fungos que se desenvolvem nas superfícies dos queijos durante o período de maturação (CARVALHO *et al.*, 2018a).

Esta infestação de ácaros nas superfícies dos queijos é visível a olho nu e caracterizada pela presença de um pó fino próximo ao queijo. Este pó, além de ser composto por ácaros mortos e excrementos, é o resultado do consumo dos queijos pelos ácaros em atividade, resultando em perdas econômicas para o processo industrial (AYGUN *et al.*, 2007; ROBERTSON, 1952).

Produtores brasileiros aprenderam com os europeus a técnica de "escovar" o queijo frequentemente para diminuir a quantidade de ácaros na superfície do queijo e conseqüentemente diminuir as perdas econômicas

destes queijos maturados intencionalmente na presença de ácaros, como é o caso do queijo francês *Mimolette* (Figura 1).

Figura 1 - Queijo *Mimolette* comercializado na França.



Fonte: Falco Bonfadini

O queijo *Mimolette* é um queijo esférico e de cor alaranjada em virtude da utilização de corante de urucum e possui um período de maturação de aproximadamente seis meses em temperaturas de 10 a 12 °C formato esférico, cor alaranjada em virtude da utilização de corante de urucum (FRANÇA, 2017). Possui crosta irregular em virtude das espécies de ácaros presentes na superfície do queijo identificadas como *Acarus siro* (MELNYK *et al.*, 2010).

Na Alemanha, um queijo tradicional maturado na presença de ácaros é *Milbenkäse*. Trata-se de um queijo tipo Quark temperado (ou não) com ervas, moldado e maturado em caixas de madeira no meio de farinha de centeio e ácaros por um período aproximado de 6 meses (BRUCKNER; HEETHOFF,

2016; HERRMANN, 2005). As espécies de ácaros presentes na maturação do *Milbenkäse* foram identificadas como *Tyrollichus casei* (MELNYK *et al.*, 2010).

Para os europeus, a presença dos ácaros durante a maturação dos queijos confere a estes produtos atributos sensoriais peculiares desejáveis e é possível encontrar na literatura a prática de compartilhamento de "sementes" (ácaros) entre queijarias francesas (FLECHTMANN, 1986). Esta prática de compartilhamento de ácaros é algo perigoso e deve ser evitada, especialmente quando se trata de compartilhamento de amostras de ácaros entre países, uma vez que é possível a introdução de uma praga inexistente na região que recebe amostras, podendo ocasionar um desequilíbrio ecológico sem precedentes.

Na literatura científica algumas espécies de ácaros presentes em queijos foram catalogadas (**Tabela 1**), sendo a presença da maioria delas considerada um problema tecnológico. Todavia, as espécies de ácaros identificadas nos queijos brasileiros maturados com ácaros (**Tabela 1**) diferem das espécies identificadas nos queijos europeus em que os ácaros durante a maturação são considerados coadjuvantes tecnológicos.



1 **Tabela 1.** Espécies de ácaros identificadas em queijos.

| Queijo         | País           | Espécies de Ácaros   | Referências                            |
|----------------|----------------|--|--|
| Stilton        | Inglaterra     | <i>Tyroglyphus siro</i> (sinonímia <i>Acarus siro</i> ), <i>Tyroglyphus longior</i> e <i>Aleurobius farinae</i>  | (EALES, 1917)                          |
| Cheddar        | Inglaterra     | <i>Carpoglyphus sp.</i> , <i>Tyroglyphus siro</i> (sin. <i>Acarus siro</i> ), <i>Tyroglyphus longior</i> e <i>Aleurobius farinae</i>   | (EALES, 1917)                          |
| Desconhecido   | Estados Unidos | <i>Tyroglyphus siro</i> (sin. <i>Acarus siro</i> ), <i>Tyroglyphus lintneri</i> , <i>Tyrophagus farinae</i> , <i>Tyrophagus longior</i> , <i>Tyrophagus terminalis</i> e <i>Carpoglyphus sp.</i> | (DEONG; ROADHOUSE, 1922)               |
| Desconhecido   | Reino Unido    | <i>Tyroglyphus longior</i> var. <i>Castellanii</i>   | (DOUWLING; THOMAS, 1942)               |
| Desconhecido   | Nova Zelândia  | <i>Tyrophagus longior</i> , <i>Tyrolichus casei</i> , <i>Tyroglyphus farinae</i> , <i>Glycyphagus domesticus</i> e <i>Glycyphagus destructor</i>   | (ROBERTSON, 1946)                      |
| Desconhecido   | Reino Unido    | <i>Acarus siro</i> , <i>Acarus chaetoxysilos</i> , <i>Acarus farris</i> e <i>Tyrophagus longior</i>  | (WILKIN, 1973)                         |
| Cheddar        | Canadá         | <i>Acarus siro</i>   | (PEACE, 1983)                          |
| Surk           | Turquia        | <i>Tyrophagus putrescentiae</i>  | (AYGUN <i>et al.</i> , 2007)           |
| Cabrales       | Espanha        | <i>Acarus farris</i> e <i>Tyrophagusneis wanderi</i>   | (SÁNCHEZ-RAMOS <i>et al.</i> , 2007)   |
| Milbenkäse     | Alemanha       | <i>Tyrolichus casei</i> *  | (MELNYK <i>et al.</i> , 2010)          |
| Mimolette      | França         | <i>Acarus siro</i> *   | (MELNYK <i>et al.</i> , 2010)          |
| Ras            | Egito          | <i>Acarus siro</i> , <i>Acarus farris</i> e <i>Carpoglyphus lactis</i>   | (DAWOOD; ALI, 2015)                    |
| Minas Colonial | e Brasil       | <i>Tyrophagus putrescentiae</i> e <i>Sancassania aff. feytaudi</i>   | (CARVALHO <i>et al.</i> , 2018b, 2020) |

2 Fonte: .CARVALHO *et al.*, 2018a adaptado pela autora.

3

Quanto ao aspecto de controle da presença dos ácaros indesejáveis, estudos avaliaram a eficácia de uso de acaricidas e óleos essenciais, no entanto, essas substâncias têm seu uso limitado na indústria alimentícia podendo refletir em um risco químico ou em designação de aromas indesejáveis no queijo, respectivamente (ABBAR *et al.*, 2017; DAWOOD; ALI, 2015; DEONG; ROADHOUSE, 1922; WILKIN, 1973; ZHAO *et al.*, 2015; SÁNCHEZ-RAMOS *et al.*, 2007)

Sánchez-Ramos *et al.* (2007a e 2007b) sugerem a redução de temperatura para o controle e/ou morte dos ácaros, porém, esta redução de temperatura pode prejudicar os processos físico-químicos e microbiológicos inerentes na maturação de queijos. Ceras e polímeros também podem ser uma alternativa no controle da infestação de ácaros, mas nem todos os queijos estão aptos para serem maturados com este tipo de barreira (ROBERTSON, 1952; ZHAO *et al.*, 2016).

A aplicação de boas práticas de fabricação com constantes limpezas é um dos métodos mais eficazes para impedir a presença de ácaros nas câmaras de maturação (DEONG; ROADHOUSE, 1922), mas estudos recentes demonstrou a eficiência do uso do ozônio neste tipo de controle (GRASSO *et al.*, 2022).

No que se refere ao aspecto de saúde, há relatos, na literatura científica, de alergias, rinites ou dermatites de trabalhadores que entram em contato com os ácaros pela manipulação de queijos (DOUWLING; THOMAS, 1942; ROBERTSON, 1952; SÁNCHEZ-BORGES; FERNANDEZ-CALDAS, 2015; VOGEL *et al.*, 2015), porém não há até o momento, relato de problemas de saúde pela ingestão de queijos maturados com ácaros.

A legislação brasileira inviabiliza a produção de queijos maturados com ácaros (BRASIL, 2014) A realização de estudos de segurança de consumo se faz necessária para permitir a produção de queijos maturados na presença de ácaros, embora o continente europeu já tenha liberado a produção deste produto sem a condução destes estudos.

Enquanto produtores de queijos brasileiros são impedidos de produzirem queijos maturados na presença de ácaros, queijos semelhantes (ISIGNY SAINTE-MÈRE, 2023) produzidos na União Europeia são permitidos de serem comercializados no Brasil, conforme disposto na **Figura 2**.

**Figura 2** - Queijo *Mimolette* importado e comercializado no Brasil.



Fonte: a autora

### 3 AVALIAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DE METABÓLITOS E COMPOSTOS VOLÁTEIS DE QUEIJOS MATURADOS COM ÁCAROS

Artigo publicado

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104806>

CARVALHO, MICHELLE M.; ALVES FILHO, ELENILSON G.; SILVA, LORENA MARA A.; MARTINS, FÁTIMA ITANA C.C.; MATIOLI, ANDRÉ L.; OLIVEIRA, EUGÊNIO E.; RODRIGUES, TIGRESSA HELENA S.; FORTES FERREIRA, CÉLIA L.L.; MACHADO DA SILVA, NORMA; ZOCCOLO, GUILHERME J.; DE DEA LINDNER, J. *Chemometric evaluation of the metabolites and volatile profiles of mite-ripened cheeses. INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL*, v. 1, p. 104806, 2020.

#### 3.1 INTRODUÇÃO

Ácaros ambientais infestam queijos durante o processo de maturação (CARVALHO *et al.*, 2018a). A maturação de queijos juntamente com ácaros é uma prática secular em alguns países europeus (HERRMANN, 2005; MELNYK *et al.*, 2010). No entanto, pesquisas que englobam a produção e a preocupação com a saúde do consumo destes queijos são relativamente novas (SOLARZ; PAJĄK, 2019). O francês Mimolette e o alemão Milbenkäse são exemplos de queijos onde a presença de ácaros contribui para características sensoriais desejáveis no produto final, e as espécies de ácaros predominantes nestes queijos já foram identificadas (MELNYK *et al.*, 2010). No entanto, estudos sobre os componentes saborizantes originados em razão da presença dos ácaros durante a maturação de queijos ainda não foram conduzidos (CARVALHO *et al.*, 2018a).

Bruckner e Heethoff (2016) identificaram aroma de limão em amostras de ácaros dos queijos *Mimolette* e *Milbenkäse*, em que as espécies *Acarus siro* e *Tyrollichus casei* estavam presentes, respectivamente. O aroma volátil identificado como neral (componente do óleo de limão) foi detectado nas glândulas opistossômicas de ambos os ácaros, porém, este composto estava ausente nas amostras de queijo. Este estudo indicou que o aroma identificado, o composto neral, era comum para ambas espécies de ácaros e era produzido e secretado por suas glândulas exócrinas, sugerindo que na ausência destes ácaros esse composto não seria produzido. No entanto, investigações com queijos comparando a presença e ausência de ácaros ainda não haviam sido realizadas (CARVALHO *et al.*, 2018).

Até recentemente, no Brasil, a presença de ácaros nos queijos era considerada um problema tecnológico. Nos últimos anos, queijeiros brasileiros, inspirados em produtos lácteos europeus, foram introduzindo esta nova técnica de maturação com a presença de ácaros. Desde então, queijos maturados na presença de ácaros passou a ser apreciado também por brasileiros (CARVALHO *et al.*, 2018a). Carvalho *et al.* (2018b) realizaram o primeiro estudo sobre queijos brasileiros maturados com ácaros e descobriram que as espécies de ácaros eram morfológica e molecularmente diferentes daquelas predominantes nos queijos europeus *Mimolette* e *Milbenkäse*. No entanto, ainda eram desconhecidos os efeitos, positivos ou negativos, provocados pela presença dos ácaros neotrópicos nos queijos brasileiros, como já estabelecido pelos ácaros presentes nos queijos europeus (MELNYK *et al.*, 2010).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi de investigar o efeito da presença dos ácaros em dois tipos de queijos brasileiros (Colonial e Minas) durante o processo de maturação por meio de análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 *Fabricação e maturação dos queijos*

Duas variedades de queijos brasileiros foram fabricados em fazendas tradicionalmente produtoras destes tipos de queijos. O queijo Minas foi produzido na cidade de Serro, Minas Gerais, Brasil e o queijo colonial foi produzido na cidade de Chapecó, Santa Catarina, Brasil, conforme descrito por Martins *et al.* (2015) e Carvalho *et al.* (2019) respectivamente.

O queijo Minas foi produzido com leite de vaca integral e cru, adicionado de coalho (Hala Christian Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil) em torno de 35 °C, em leite contendo soro fermento natural. Quando o ponto de coalhada foi atingido, a coalhada foi cortada e agitada por aproximadamente 5 minutos, moldado, pressionado à mão e salgado com sal seco (Sal Cisne, Cabo Frio, Rio de Janeiro,

Brasil) na superfície do queijo em temperatura ambiente. Os queijos fabricados foram mantidos por cerca de 20 horas na fôrma e, quando necessário, virados para facilitar a drenagem do soro e homogeneidade da salga.

O queijo Colonial foi produzido com leite de vaca integral pasteurizado (65 °C por 30 min), adicionado de fermento lácteo natural e coalho (Hala Christian Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil). Uma vez atingido o ponto de corte, a coalhada foi cortada, cozida a 40 °C e agitada por aproximadamente 5 min. Depois disso, a massa foi moldada, prensada mecanicamente e salgada (Sal Cisne, Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil) em tanques de salmoura com 20% (p / v) de sal por aproximadamente 20 h a cerca de 8 °C de temperatura.

Os queijos Minas e Colonial foram maturados na mesma sala de maturação (cidade de Serro, Minas Gerais, Brasil) em diferentes prateleiras de madeira (com e sem ácaros) por seis meses, a temperatura ambiente de 15,2 a 22,8 °C (média 19,0 °C) e umidade relativa oscilando entre 83% e 89% (média 86%).

O estudo avaliou a produção de três repetições (três lotes distintos) para cada queijo.

### 3.2.2 Identificação das espécies de ácaros presentes nos queijos

Os ácaros de queijos Minas e Colonial foram identificados seguindo a metodologia descrita por Carvalho *et al.* (2018b). Resumidamente, os ácaros foram observados em um microscópio de contraste de interferência diferencial modelo Eclipse Ni, Nikon, após a montagem em lâminas de microscopia contendo meio Hoyer. Nas amostras em que foram observadas diferentes morfologias, a quantificação de cada tipo foi estimada após observação das espécies individuais em estereomicroscópio de 30x de aumento (modelo SMZ800, Nikon). Os espécimes foram identificados com base em chaves dicotômicas para famílias e espécies.

### 3.2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Para os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN), cada amostra foi pulverizada com nitrogênio líquido, e aproximadamente 25,0 mg foi solubilizado em 550  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  contendo 1,13 mg  $\text{mL}^{-1}$  de TMSP-d4 (padrão interno) e 0,4 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tampão ajustado de acordo com o pH das amostras (SHINTU; CALDARELLI, 2005). O sobrenadante foi transferido para tubos de 5 mm RMN.

Os experimentos RMN foram realizados em um espectrômetro Agilent 600-MHz (14,1 T; Agilent, Santa Clara, EUA) que foi equipado com uma detecção inversa de 5 mm (H-F/15N-31P) Um Probe™ com grau Z blindado ativamente. Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN foram adquiridos em quintuplicado utilizando a seqüência de pulsos PRESAT para supressão de água ( $\delta$  4.77), com pulso firme calibrado a  $90^\circ$  (8,95 s de comprimento de pulso a 58 dB de potência). Além disso, 16 varreduras, 48 K de pontos de domínio temporal com uma janela espectral de 16,0 ppm, tempo de aquisição de 5,0 s e atraso de relaxamento de 30,0 s foram usados para adquirir os dados. O valor pré-fixado para o ganho do receptor foi alcançado através da comparação de espectros com a mesma relação sinal ruído, que foi mantida para todas as aquisições espectrais a uma temperatura controlada de 298 K (ALVES FILHO *et al.*, 2018). Os decaimentos de indução livre foram multiplicados por uma função exponencial equivalente a 0,3 Hz de cobertura de linha antes da aplicação da transformada de Fourier para 32 K pontos. A correção de fase foi realizada manualmente, e a correção de linha de base foi aplicada em toda a faixa espectral.

Os constituintes dos queijos foram identificados usando espectroscopia bidimensional RMN (2D-RMN). Isto incluiu espectroscopia de correlação (*Correlation Spectroscopy* - COSY), coerência quântica heteronuclear única (*Heteronuclear Single Quantum Coherence* - HSQC) e avaliações de correlação heteronuclear múltipla (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation* - HMBC) baseadas no banco de dados de acesso aberto ([www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca)) e em literatura anterior (CONSONNI; CAGLIANI, 2008; DE ANGELIS CURTIS *et al.*, 2000; MAZZEI; PICCOLO, 2012; SHINTU; CALDARELLI, 2005). Os experimentos 2D-RMN foram realizados utilizando as seqüências de pulso da biblioteca de espectrômetros padrão. Os

experimentos COSY foram obtidos com uma largura espectral de 18.028,1 Hz em ambas as dimensões; matriz de dados 1442 × 200; 16 varreduras por incremento de t1, e atraso de relaxamento de 1,0 s. HSQC foi adquirido com um atraso de evolução de 1,7 ms para uma média de 1J (C,H) de 145 Hz; matriz de dados 1442 200, 32 varreduras por incremento de t1, largura espectral de 9615. 4 Hz em f2 e 30.165,9 Hz em f1, e atraso de relaxamento de 1,0 s. HMBC foi registrado com um atraso de evolução de 50,0 ms para LRJ (C,H) de 10 Hz; matriz de dados de 1442 × 200, 64 varreduras por incremento t1, larguras espectrais de 9615,4 Hz em f2 e 30.165,9 Hz em f1, e atraso de relaxamento de 1,0 s.

### 3.2.4 Análise de quimiometria por conjunto de dados <sup>1</sup>H RMN

A análise quimiométrica foi realizada para determinar os vários metabólitos primários produzidos pela presença do açúcar durante a maturação na superfície (zona externa - crosta) e núcleo (zona interna) do queijo. Porções internas e externas (0,5 cm da casca do queijo) foram obtidas do queijo e raladas antes das análises.

Um total de 60 espectros de <sup>1</sup>H RMN do queijo curado à superfície na ausência de ácaros, queijo curado à superfície na presença de ácaros, núcleo de queijo curado na ausência de ácaros e núcleo de queijo curado na presença de ácaros foram adquiridos, contemplando a extração triplicada e aquisição de RMN quintuplicado para análise multivariada. Uma matriz numérica com a dimensionalidade de 1.731.060 pontos de dados (60 espectros RMN <sup>1</sup>H × 28.851 variáveis no espectro inteiro) foi criada para cada tipo de queijo. Os espectros foram convertidos para arquivos do *American Standard Code for Information Interchange* (ASCII) para a construção das matrizes numéricas.

Para reduzir a dimensionalidade dos dados originais e observar a composição do queijo curado na presença de ácaros, as matrizes foram exportadas para análise quimiométrica não supervisionada pela *Principal Component Analysis* (PCA) usando o programa 10.4 do The Unscrambler X™ (software CAMO, Woodbridge, NJ, EUA). Algoritmos para correção da linha de base dos espectros e



alinhamento de sinais usando o método COW (*Correlation Optimized Warping* com comprimento de seguimento de 50 e folga de 5) foram aplicados nos conjuntos de dados  $^1\text{H}$  RMN (matrizes de queijo Minas e Colonial). Além disso, as áreas de sinais em cada espectro foram normalizadas para reduzir erros experimentais intrínsecos, e as amostras foram centradas no meio para evitar influências negativas de sinais menores não identificados e ruídos. Após o processamento dos dados, o algoritmo de *Singular Value Decomposition* (SVD) foi aplicado para decompor cada matriz numérica em pontuações e carregamentos abaixo de 95% do nível de confiança (SOUSA *et al.*, 2013).

### 3.2.5 Cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS)

*Microextração em fase sólida por Headspace* (HS-SPME) combinado com Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (GC-MS) foi aplicada na análise do queijo. Para análise de por GC-MS, 1 g de queijo ralado foi misturado a 2 g de água e 1 g de NaCl e transferido para um vial de 20 mL para equilíbrio a 60 °C por 10 min com agitação constante (500 rpm). Um suporte SPME automático (Supelco, Bellafonte, PA, USA) com uma fibra flexível estável 30–50  $\mu\text{m}$  *Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane* (DVB/CAR/PDMS) foi usada para o experimento. A fibra DVB/CAR/PDMS foi exposta na região dos voláteis da amostra (*headspace*) por 25 minutos.

Uma vez extraídos os compostos orgânicos voláteis (COVs), a fibra DVB / CAR / PDMS foi introduzida no injetor de cromatógrafo gasoso (GC) (20: 1) e foi mantida a 260 °C por 3 min. As amostras foram analisadas em equipamento de CG-MS (Agilent 5977A) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-WAX (Agilent 122-7032) (30 m  $\times$  0,25 mm diâmetro interno, espessura de filme 0,25  $\mu\text{m}$ ) conectada a um detector quadrupolo operando em o modo EI a 70 eV. Os dados foram adquiridos na faixa de massa de varredura de 40 a 650 m / z e taxa de amostragem de 1,6 scans.s<sup>-1</sup>. O hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e da interface foram de 260 e 280 °C, respectivamente. A rampa de temperatura ajustou-se em 50 °C por 1 min e depois

aumentou para 250 °C a 5 °C min<sup>-1</sup>. A temperatura final (250 °C) foi mantida por 14 min. A identificação dos compostos foi realizada comparando-se os índices de retenção com os dos compostos conhecidos, obtidos por injeção de uma mistura de padrões contendo séries homólogas de alcanos C7-C30 analisados na mesma coluna e nas mesmas condições cromatográficas (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963). Os picos foram identificados com base em padrões de fragmentação usando o NIST *Mass Spectral Search Program* (version 2.0 – 287,324 compounds; Washington, DC, EUA) e literatura existente (BERTUZZI *et al.*, 2018).

### 3.2.6 Análises de quimiometria por CG-MS *dataset*

A análise quimiométrica foi realizada para investigar os COVs produzidos na superfície e núcleo de queijos maturados na presença e ausência de ácaros, separadamente. Para isto, foram adquiridos 12 cromatogramas de extração triplicada da superfície e do núcleo para avaliação multivariada. Os cromatogramas na região entre 2,0 e 32,0 min foram selecionados para análise quimiométrica não supervisionada por PCA, o que resultou em matrizes numéricas com uma dimensionalidade de 51.912 dados - 4.326 variáveis × 12 amostras para cada tipo de queijo (Minas e Colonial). Como desenvolvido para o conjunto de dados RMN, o PCA foi realizado usando os mesmos parâmetros estatísticos e pré-tratamento descritos no item 2.3.1.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Identificação das espécies de ácaros do queijo

Os queijos foram maturados com ácaros presentes naturalmente em ambientes neotropicais (CARVALHO *et al.*, 2018b). Embora não tenha sido medida quantitativamente a infestação de ácaros, realizou-se um controle qualitativo,

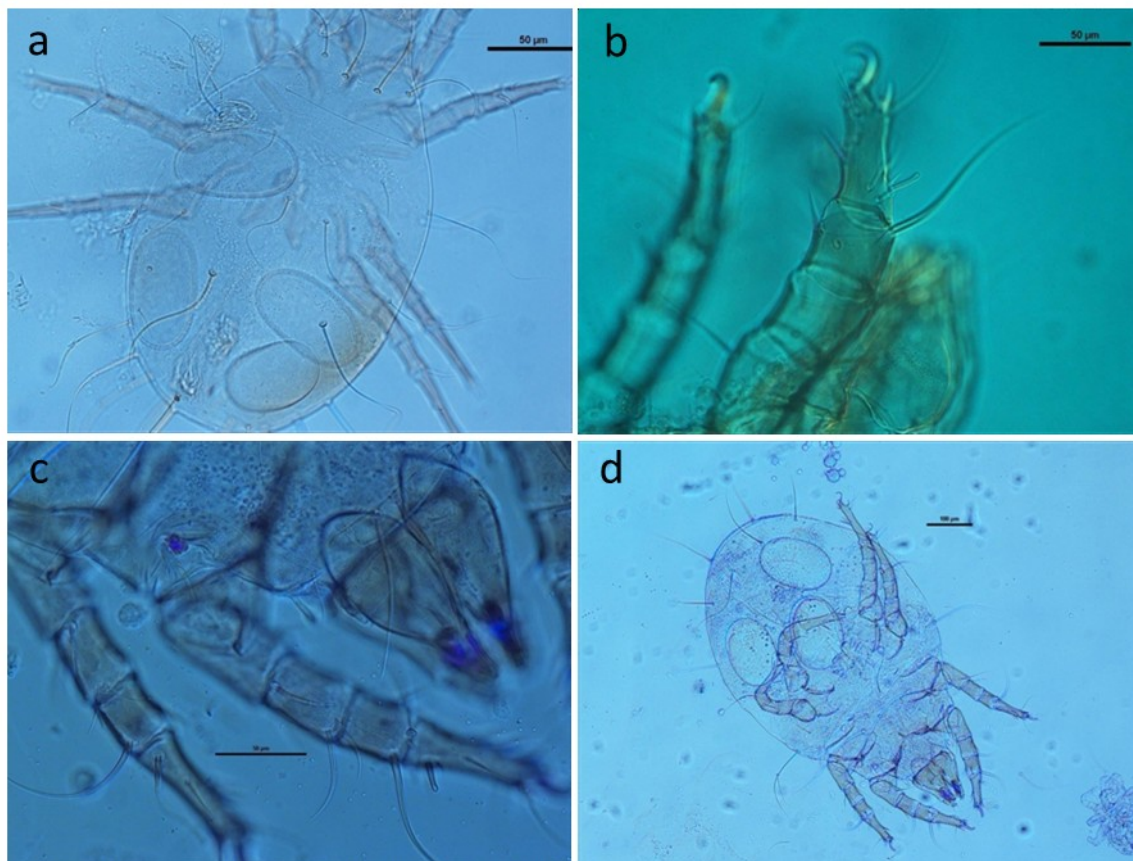
semanalmente, com coletas e identificações das espécies de ácaros. Quanto aos queijos controle (na ausência de ácaros na casca), eram continuamente inspecionados e, apesar da ausência total de quaisquer infestações de ácaros, estes queijos tinham suas cascas escovadas e lavadas com água corrente semanalmente, para reforçar as condições ambientais que desfavoreciam o estabelecimento de ácaros (SÁNCHEZ-RAMOS; CASTAÑERA, 2009) aplicando a técnica usual de maturação destes tipos de queijos (CARVALHO *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2015).

A infestação foi monitorada continuamente através de inspeção visual das características típicas de infestações de ácaros, como a formação de um pó fino na superfície do queijo, a presença de organismos que se movem visivelmente no pó e a formação de crateras na casca do queijo. Este é o controle usual realizado por fabricantes de queijo em todo o mundo (CARVALHO *et al.*, 2018a).

As análises morfológicas indicaram que os ácaros presentes nos queijos eram predominantemente *Tyrophagus putrescentiae*. No queijo Minas, *Sancassania aff. feytaudi* e *Tyrophagus putrescentiae* foram identificados com 35% e 65% de abundância, respectivamente. Para o queijo colonial, apenas a espécie *T. putrescentiae* foi identificada (**Figura 1**).

Durante a maturação do queijo colonial na presença de ácaros, a infestação demorou em torno de 30 dias após o início da maturação para acontecer, em comparação com a do queijo Minas maturados na presença de ácaros (dados não mostrados). Foi observada formação de óleo na superfície desse queijo, o que poderia explicar o atraso na fixação do ácaro e a presença de apenas uma espécie (CARVALHO *et al.*, 2018b). Variações de espécies de fungos na superfície do queijo também pode influenciar na seleção de espécies de ácaros presentes, como observado por HUBERT *et al.*, (2004).

**Figura 1** - Ácaros identificados nos queijos - a) Vista dorsal de *Tyrophagus putrescentiae* (aumento de 200x); b) Tarsus I de *Tyrophagus putrescentiae* com ênfase nos solenídeos w1 e wi (aumento de 1000x); c) Gnatossoma de *Sancassania* aff. *feytaldi* com ênfase nos solenídeos w1 e wi (aumento de 400x); d) Vista ventral de *Sancassania* aff. *feytaldi* (aumento de 40x).



Fonte: CARVALHO (2018).

### 3.3.2 Variação dos metabólitos na produção de queijos maturados com e sem ácaros

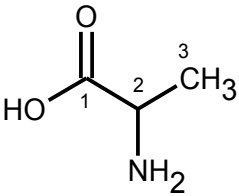
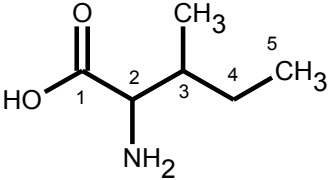
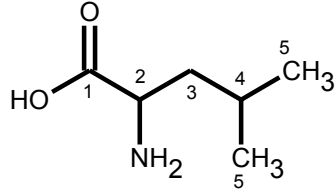
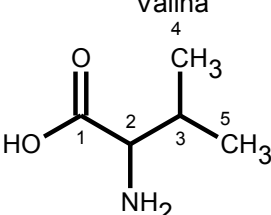
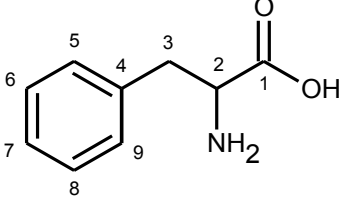
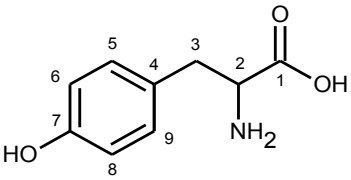
Tanto o queijo Minas como o Colonial apresentaram alta complexidade com 1.731.060 pontos de dados (60 amostras  $\times$  28.851 variáveis no espectro total), e foi desenvolvida uma análise quimiométrica não supervisionada para obter informações rápidas com uma avaliação de alta qualidade das mudanças nos metabólitos primários, demonstrando assim uma melhor compreensão do efeito da presença de ácaros no queijo. Esta abordagem não direcionada é útil porque os compostos e produtos de transformação/degradação nem sempre são conhecidos (ALVES FILHO *et al.*, 2017). As **figuras 2a** e **3a** ilustram os resultados da avaliação PCA do

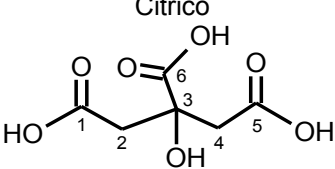
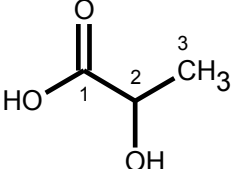
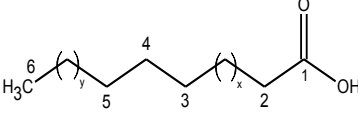
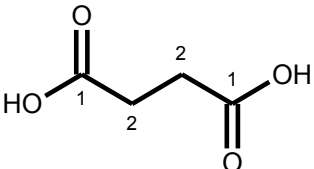
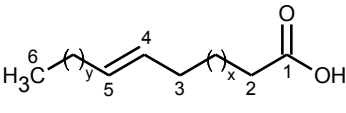
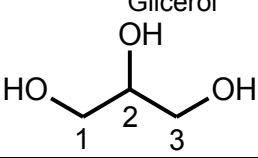
conjunto de dados RMN dos queijos Minas e Colonial, com 91,04 e 92,71% de variação total, respectivamente. A **Tabela 1** descreve as estruturas moleculares, deslocamentos químicos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , multiplicidade e constante de acoplamento dos metabólitos primários detectados em ambos os tipos de queijos (Minas e Colonial), que foram relevantes para sua discriminação de acordo com a presença do açúcar.

A avaliação PCA dos queijos Minas e Colonial apresentam claramente o efeito da presença dos ácaros nas cascas dos queijos, assim como o efeito reduzido ou a ausência de qualquer efeito da presença dos ácaros no núcleo dos queijos (**Figura 2a e 3a**). De acordo com o eixo PC1, os ácaros influenciaram na diminuição dos ácidos lácticos e graxos na superfície de ambos os tipos de queijo (**Figura 2b e 3b**). Por outro lado, os ácaros influenciaram no aumento de glicerol, alanina e ácido cítrico. Em particular, a presença dos ácaros aumentou a quantidade de tirosina e fenilalanina na casca do queijo Minas e diminuiu o conteúdo de valina, leucina e isoleucina na casca do queijo Colonial. Estes dois tipos de queijos são preparados com diferentes culturas lácteas, podendo justificar a presença de diferentes aminoácidos oriundos das proteólises enzimáticas, além da diferença de composição do leite e do processo tecnológico (GOLOVNYA *et al.*, 2016). Com base no eixo PC2, foi observado um efeito fraco dos ácaros no núcleo do queijo para os queijos maturados na presença de ácaros.

Quanto ao aspecto visual dos queijos maturados com ácaros, foi desenvolvida uma cor marrom na casca dos queijos Minas e Colonial durante a maturação (**Figura 4**). Este marrom pode ser explicado pela reação entre aminoácidos formados e açúcares redutores presentes no meio (reação de Maillard) (GOLOVNYA *et al.*, 2016), que confere ao produto um sabor de caramelo, identificado pelos produtores de queijos brasileiros maturados com ácaros como um sabor adocicado. Esta reação pode ser resultado da ação das enzimas proteolíticas dos ácaros e pode ser a maior contribuição dos ácaros do queijo durante o processo de maturação. O queijo Minas continha uma maior quantidade de aminoácidos livres e também apresentava maior escurecimento durante a maturação (**Figura 4**). Isto pode ser resultado da presença de mais ácaros infestando o queijo e, também, em virtude deste queijo ser colonizado pelos ácaros em torno 30 dias antes do queijo Colonial.

**Tabela 1** - Metabolitos identificados em queijos minas e coloniais maturados na presença e ausência de ácaros.

| Composto/Estrutura  | $\delta^1H$<br>(multiplicity, J in Hz)  | $\delta^{13}C$                                   | Ref.<br>$^1H$   | Ref.<br>$^{13}C$                     |
|---|---|--|---|--------------------------------------|
| <b>Aminoácidos</b>  |   |  |   |                                      |
| Alanina   |   |  |   |                                      |
|    | 3 - 1.33 ( <i>d</i> 7.2)<br>2 - 3.89 ( <i>o</i> )   | 17.9<br>53.1                                     | 1.52 ( <i>d</i> 7.30)<br>3.90 ( <i>q</i> 7.30)  | 19.1<br>53.4                         |
| <b>3.3.3</b>  |   |  |   |                                      |
| Isoleucina  |   |  |   |                                      |
|    | 2 - <i>no</i><br>3 - 1.80 ( <i>o</i> )<br>4 - 1.48 ( <i>o</i> )<br>5 - 1.02 ( <i>o</i> )<br>6 - 1.02 ( <i>o</i> ) | <i>o</i><br>37.0<br>27.7<br>16.0<br>17.5         | 3.65 ( <i>n</i> )<br>1.96 ( <i>m</i> )<br>1.45 ( <i>m</i> )<br>0.92 ( <i>d</i> 7.1)<br>0.99 ( <i>d</i> 7.1) | 62.5<br>38.7<br>27.0<br>13.9<br>17.4 |
| Leucina   |   |  |   |                                      |
|  | 2,3,4 - <i>no</i><br>5.6 - 0.97 ( <i>d</i> 6.0)   | <i>no</i><br>42.7<br>23.4<br>24.7                | 3.90 ( <i>no</i> )<br>1.73 ( <i>m</i> )<br>0.96 ( <i>dt</i> )   | <i>n</i><br>42.8<br>23.9 27.0        |
| Valina  |   |  |   |                                      |
|  | 2 - 3.62 ( <i>o</i> )<br>3 - 2.28 ( <i>o</i> )<br>4 - 0.98 ( <i>d</i> 7.2)<br>5 - 1.05 ( <i>d</i> 7.2)            | <i>o</i><br><i>o</i><br>19.3<br>20.8             | 3.82 ( <i>d</i> 4.4)<br>2.33 ( <i>m</i> )<br>1.02 ( <i>d</i> 7.1)<br>1.06 ( <i>d</i> 7.1)                   | <i>n</i><br>32.0<br>19.1<br>20.9     |
| Fenilalanina  |   |  |   |                                      |
|  | 5.9 - 7.24 ( <i>m</i> )<br>6.8 - 7.42 ( <i>m</i> )<br>7 - 7.32 ( <i>m</i> )                                       | 132.<br>0<br>131.<br>8<br>131.<br>7              | 7.32 ( <i>d</i> 6.98)<br>7.42 ( <i>m</i> )<br>7.37 ( <i>m</i> )   | 132.1<br>131.8<br>130.4              |
| Tirosina  |   |  |   |                                      |
|  | 6.8 - 6.91 ( <i>m</i> )<br>5.9 - 7.20 ( <i>m</i> )<br>2 - ( <i>o</i> )<br>3 - 3.04 ( <i>o</i> )                   | 118.<br>7<br>133.<br>7<br><i>no</i><br><i>no</i> | 6.89 ( <i>m</i> )<br>7.19 ( <i>m</i> )<br>3.93 ( <i>dd</i> )<br>3.06 ( <i>dd</i> )                          | 118.9<br>133.5<br>59.0<br>38.3       |

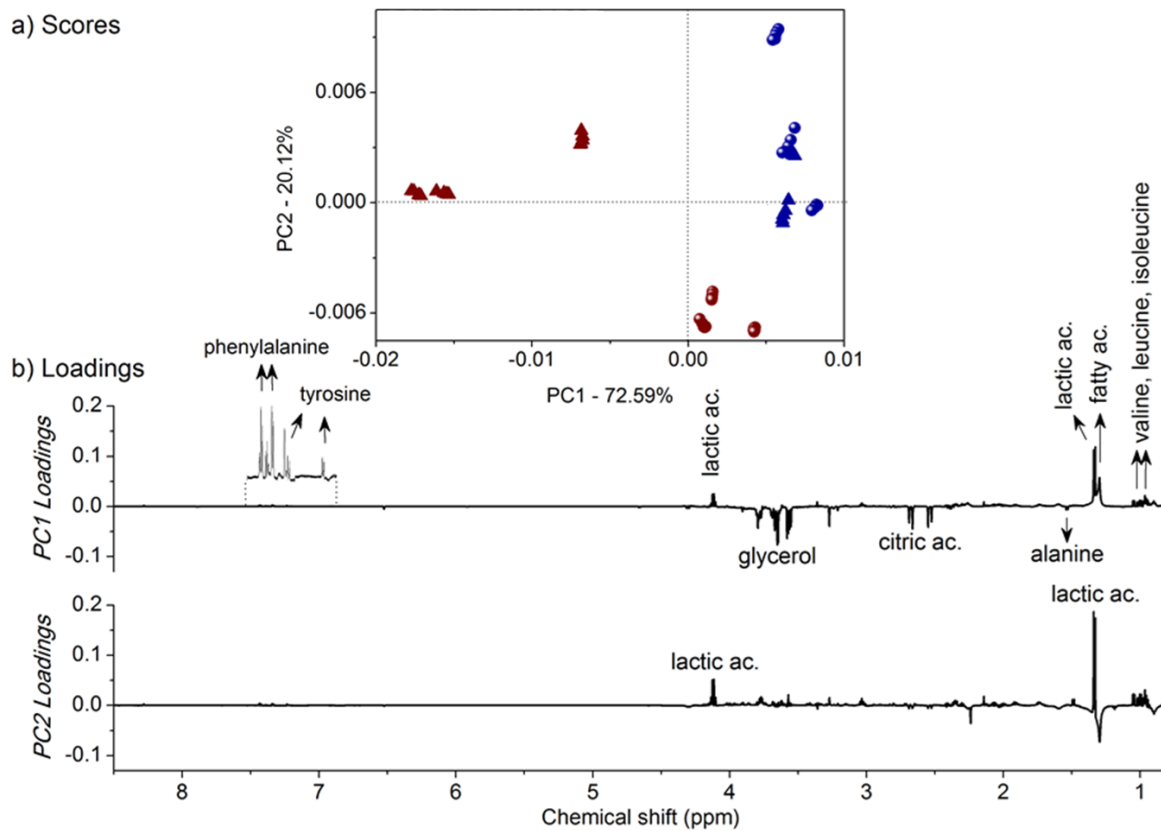
| Ácidos Orgânicos  |                           |      |                            |       |
|---|---------------------------|------|----------------------------|-------|
| Citrico   |                           |      |                            |       |
|    | 2 – 2.53 ( <i>d</i> 15.0) | 48.8 | 2.52 ( <i>d</i> 15.8)      | 48.6  |
|   | 4 – 2.68 ( <i>d</i> 15.0) | 48.8 | 3.66 ( <i>d</i> 15.8)      | 48.6  |
| Lático  |                           |      |                            |       |
|    | 3 – 1.33 ( <i>d</i> 7.2)  | 23.0 | 1.37 ( <i>d</i> 7.2)       | 22.9  |
|   | 2 – 4.12 ( <i>d</i> 7.2)  | 71.4 | 4.42 ( <i>q</i> 7.2)       | 71.4  |
| Ácido graxo saturado  |                           |      |                            |       |
|   | 6 – 0.93                  | 15.3 | 0.89                       | 14.1  |
|   | 2 – 2.26                  | 34.0 | 2.34                       | 34.0  |
|   | 3,4,5 – 1.60              | 24.3 | 1.58                       | 24.5  |
| Succinico   |                           |      |                            |       |
|  | 2 - 2.42 ( <i>s</i> )     | 36.9 | 2.39 ( <i>s</i> )          | 36.8  |
|   |                           |      |                            |       |
| Ácido graxo insaturado  |                           |      |                            |       |
|  | 3 – 2.04                  | 29.9 | 2.05                       | 27.2  |
|   | 2 – 2.26                  | 34.0 | 2.34                       | 34.0  |
|   | 4,5 – 5.33                | 132. | 5.37                       | 130.2 |
|   | 6 – 0.93                  | 5    | 0.89                       | 14.1  |
|   |                           | 15.3 |                            |       |
| Outros Compostos  |                           |      |                            |       |
| Glicerol  |                           |      |                            |       |
|  | 1 – 3.57 ( <i>m</i> )     | 65.2 | 3.55 ( <i>m</i> )          | 65.5  |
|   | 3 – 3.80 ( <i>m</i> )     | 75.3 | 3.77 ( <i>tt</i> 6.5, 4.4) | 75.0  |
|   | 2 – 3.66 ( <i>m</i> )     | 65.2 | 3.64 ( <i>m</i> )          | 65.5  |

s: simples; *d*: duplo; *t*: triplo; *q*: quádruplo; *quin*: quintuplo; *dd*: duplo duplo; *dt*: duplo triplo; o: sinal de sobreposição; n: nenhuma informação; no: não observado.





**Figura 3** – PC1 × PC2 score com o sistema de coordenadas (a) e as cargas traçadas em forma de linhas (b) para o núcleo (azul) e superfície (vermelho) do queijo Colonial maturado na presença (triângulo) ou ausência (círculo) de ácaros.



**Figura 4.** Queijo Minas maturado com (direita) e sem (esquerda) ácaros.



Fonte: CARVALHO (2018).

#### 3.3.4 Variação dos compostos orgânicos voláteis durante a produção de queijos maturados com e sem ácaros

Devido à complexidade dos dados do CG – MS, uma análise quimiométrica não supervisionada da PCA foi desenvolvida para explorar a influência dos ácaros nos COVs dos queijos Minas e Colonial. As **figuras 5a** e **6a** ilustram o gráfico de pontuações plotado em duas dimensões (PC1 × PC2) da avaliação dos queijos Minas e Colonial, com variância total de 80,4% e 64,2%, respectivamente. As **figuras 5b** e **6b** representam as cargas plotadas em forma de linha, com um total de 13 e 11 compostos identificados como variáveis importantes para a discriminação dos queijos. A caracterização dos COVs foi baseada em índices de retenção reportados por NIST (ADAMS, 1997; HAKEN e MADDEN, 1985) e pela comparação com registros de Bellesia *et al.* (2003); Bertuzzi *et al.*, (2018); Kaminarides; Stamou e

Massouras (2007) e Karahadian; Josephson e Lindsay (1985). A **Tabela 2** descreve os parâmetros de caracterização dos COVs para ambos os tipos de queijos, que podem ser reconhecidos a partir dos gráficos (**Figuras 5b e 6b**) pelos seus tempos de retenção. Ésteres, álcoois e cetonas foram as classes dominantes de COVs em ambos os queijos, com e sem o açúcar.

Em geral, as **Figuras 5a e 6a** demonstraram uma característica de agrupamento entre as amostras do meio do queijo, tanto do queijo Minas como do queijo Colonial. Isto sugeriu que os ácaros não influenciaram nos COVs no núcleo dos queijos. Entretanto, os ácaros afetaram significativamente a composição superficial de ambos os tipos de queijo. Os eixos PC1 e PC2 relacionam a composição do queijo, separando o núcleo e a superfície e a presença ou ausência de ácaros, respectivamente.

Os eixos PC1 (**Figura 5b**) do queijo Minas, maturado na ausência de ácaros, mostram que a superfície tinha uma maior quantidade de 2-pentanona (3,14 min) e 2-heptanona (6,49 min) e menores quantidades de ácido butanóico (17,11 min), álcool benzílico (22,65 min), ácido octanóico (26,42 min) e ácido n-decanóico (30,35 min) em comparação com o núcleo do queijo. Já os eixos PC2 (**Figura 5b**) do mesmo queijo maturado na presença de ácaros, apresentaram na superfície um aumento na quantidade de butanoato de isoamil (9,07 min), 2-nonanol (14,72 min), ácido butanóico (17,11 min) e ácido n-decanóico (30,35 min) e uma diminuição na quantidade de 2-pentanona (3,14 min), 2-pentanol (5,48 min), 2-heptanona (6,49 min), caproato de etila (7,60 min), butanoato de isoamil (9,07 min), 2-nonanona (11,46 min), ácido octanóico (26,42 min) e ácido nonanóico (28,46 min) em comparação com o núcleo do queijo.

Os eixos PC1 (**Figura 6b**) do queijo Colonial, maturado na ausência de ácaros, preveem na superfície uma quantidade maior de 2-heptanona (6,49 min), 2-nonanona (11,46 min), 2-nonanol (14,72 min), ácido octanóico (26,42 min), e ácido n-decanóico (30,35 min), e uma quantidade menor de ácido butanóico (17,11 min) e ácido hexanóico (22,05 min), de forma semelhante, em comparação com o queijo Minas. Os eixos PC2 (**Figura 6b**) representam na superfície e núcleo um aumento dos seguintes compostos sobre a presença de ácaros: 2-pentanona (3,14 min, contrastando com o observado para o queijo Minas (**Figura 5b**), butanoato de

isoamil (9,07 min), 2-nonanol (14,72 min), e 3-metilbutil éster (18,11 min). Uma diminuição em 2-nonanona (11,46 min), ácido butanóico (17,11 min), ácido octanóico (26,42 min), ácido nonanóico (28,46 min), e ácido n-decanóico (30,35 min) também foi observada simultaneamente.

Os COVs comuns nas superfícies dos queijos Minas e Colonial maturados com ácaros foram butanoato de isoamil e 2-nonanol, ambos podem conferir ao queijo um sabor frutado (ANSCHAU *et al.*, 2011; PENNARUN *et al.*, 2002). O 2-nonanol é encontrado em queijos mofados como Camembert, Roquefort e Gorgonzola (GURKAN *et al.*, 2018; LUIGI MOIO *et al.*, 2000; PENNARUN *et al.*, 2002). Este composto é também um feromônio encontrado em vários insetos (WENNINGER *et al.*, 2017) e pode atraí-los para o queijo, colocando assim um problema na produção desse tipo de queijo com relação a presença de ácaros quando esta presença não for desejável.

O ácido butanóico (ácido butírico), um composto que pode designar um odor rançoso e desagradável presente em grandes quantidades na superfície do queijo Minas amadurecido com ácaros, geralmente está associado à ação de *Clostridium* (espécies *butyricum* ou *tyrobutyricum*) presente no leite (BRÄNDLE *et al.*, 2016). Essa diferença na produção de ácido no núcleo e na superfície pode estar associada à variação do pH nessas partes do queijo, fenômeno comum em queijos de casca mofada (GURKAN *et al.*, 2018; LUIGI MOIO *et al.*, 2000; PENNARUN *et al.*, 2002).

Os compostos ácido n-decanóico (ácido caprico), presentes no queijo Minas, e 3-metilbutil éster (acetato de isoamil) e 2 pentanona, presentes no queijo Colonial, em maior quantidade na superfície maturada na presença de ácaros, são compostos utilizados na indústria alimentícia para transmitir aroma de coco e banana nos produtos (LEKSHMI SHEELA *et al.*, 2016; PADILHA *et al.*, 2018). Além disso, de acordo com o Banco de Dados de Pesticidas da União Européia, o ácido n-decanóico é um acaricida, e o éster 3-metil um ferormônio presentes em abelhas (BOCH *et al.*, 1962). Aroma de coco, é comumente encontrado em produtos lácteos que requerem aquecimento, além do conteúdo de ácidos nanoanóico e n-decanóico (GOLOVNYA *et al.*, 2016), justificando sua presença significativa na superfície de queijo colonial maturado com e sem ácaros. Este queijo é feito com leite

pasteurizado e, seu processo de aquecimento, pode ter favorecido a produção destes compostos (KEENEY; PATTON, 1956).

Bruckner e Heethoff (2016) identificaram nas glândulas de *T. casei* e *A. siro*, ácaros presente nos queijos *Mimolette* e *Milbenkäse*, um COV (neral) responsável por um aroma de limão, e relacionaram sua presença com o sabor frutado desses queijos. Este composto não foi encontrado no presente trabalho com os queijos Minas e Colonial maturados com ácaros, o que nos leva a inferir que esses compostos não são os responsáveis pelo sabor frutado conforme conclusão dos autores Bruckner e Heethoff (2016).

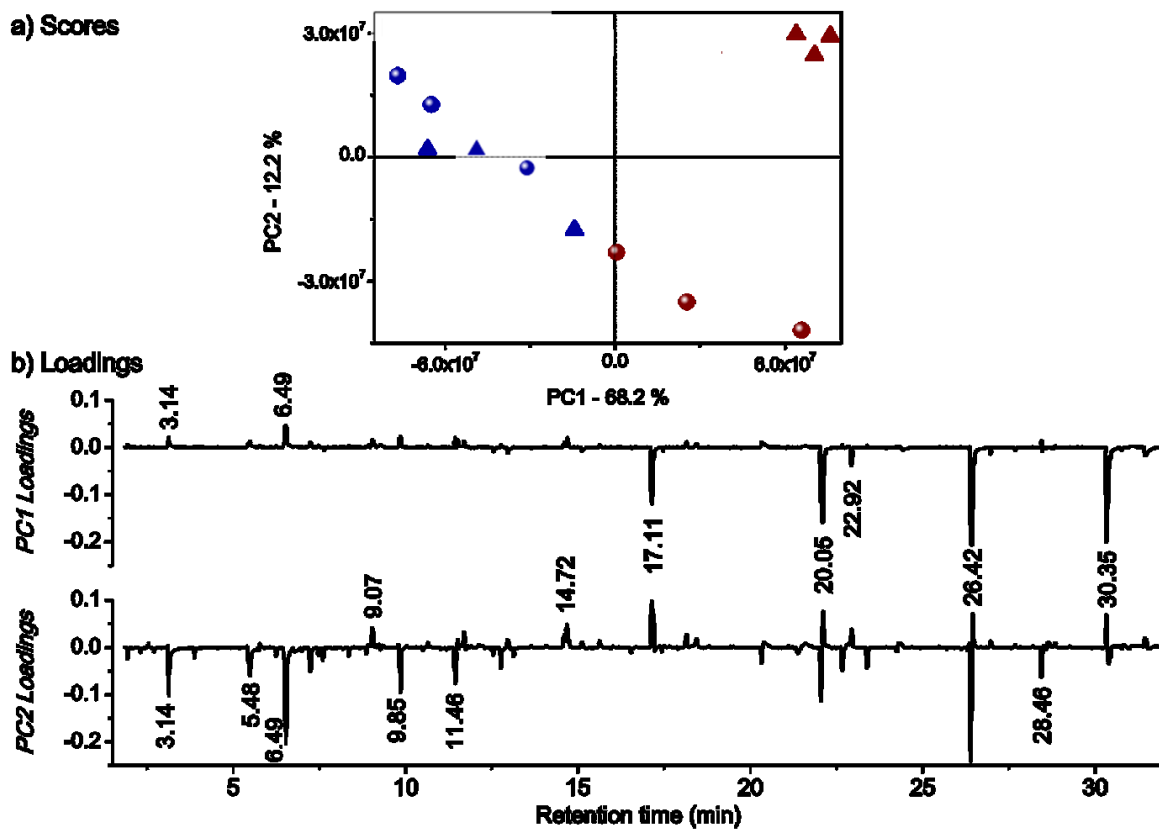
Kuramitsu et al. (2019) relataram que as fêmeas de *Tremex apicalis*, que parasitam a madeira, infestam a mesma através da produção de COV por seus fungos hospedeiros que as atraem. Os ácaros provavelmente usam o mesmo mecanismo se alojarem no queijo, uma vez que infestam o queijo após um período de maturação suficiente para a produção de COVs pelos fungos de queijo (CARVALHO et al., 2018b).

**Tabela 2.** Componentes orgânicos voláteis relevantes detectados em queijos Minas e Colonial, maturados com e sem ácaros, de acordo com PCA,.

| RT (min) | Composto                               | Descrição do odor**        | Referência RI | Experimento RI | Major m/z | Match (%) | Referências                       |
|----------|--|----------------------------|---------------|----------------|-----------|-----------|-----------------------------------|
| 3.14     | 2-pentanona                            | Frutado, éter              | 985           | 981            | 43        | 91.3      | (MÉNAGER <i>et al.</i> , 2004)    |
| 3.87     | ácido butanóico, éster etílico         | Maçã                       | 1035          | 1036           | 71        | 92.4      | (POZO-BAYÓN <i>et al.</i> , 2007) |
| 5.48     | 2-pentanol                             | Verde                      | 1138          | 1128           | 45        | 82.4      | (AUBERT <i>et al.</i> , 2003)     |
| 6.49     | 2-heptanona                            | Gramma verde               | 1184          | 1184           | 43        | 94.0      | (POZO-BAYÓN <i>et al.</i> , 2007) |
| 7.23     | 1-butanol, 3-metil-                    | Whiskey, malte, queimado   | 1185          | 1213           | 55        | 92.7      | (REZENDE; FRAGA, 2003)            |
| 7.60     | caproato de etila                      | Casca de maçã, frutado     | 1234          | 1232           | 88        | 90.3      | (MEHINAGIC <i>et al.</i> , 2006)  |
| 9.07     | butanoato de isoamilo                  | Frutado                    | *             | 1264           | 71        | 94.8      | (FERRARI <i>et al.</i> , 2004)    |
| 9.85     | 2-heptanol                             | Erva, grama verde          | 1319          | 1325           | 45        | 94.4      | (FAN; QIAN, 2006)                 |
| 11.46    | 2-nonanona                             | Frutado                    | 1390          | 1391           | 58        | 95.5      | (POZO-BAYÓN <i>et al.</i> , 2007) |
| 14.72    | 2-nonanol                              | Frutado, pepino            | 1530          | 1524           | 45        | 92.8      | (ZHAO <i>et al.</i> , 2009)       |
| 17.11    | ácido butanóico                        | Queijo, ranço              | 1628          | 1628           | 60        | 90.2      | (REZENDE; FRAGA, 2003)            |
| 18.11    | ácido octanóico, 3-éster metilbutílico | Queijo, fermentação        | 1658          | 1659           | 70        | 83.8      | (LEDAUPHIN <i>et al.</i> , 2004)  |
| 20.34    | *                                      |                            | -             | 1767           |           |           | -                                 |
| 22.05    | ácido hexanóico                        | Queijo, gordura            | 1849          | 1847           | 60        | 96.6      | (REZENDE; FRAGA, 2003)            |
| 22.65    | Álcool benzílico                       | Doce, flores               | 1877          | 1877           | 79        | 92.2      | (NAGARAJAN <i>et al.</i> , 2001)  |
| 22.92    | *                                      |                            | -             | 1884           |           |           | -                                 |
| 26.42    | ácido octanóico                        | Queijo, fermentação        | 2067          | 2060           | 60        | 91.5      | (POZO-BAYÓN <i>et al.</i> , 2007) |
| 28.46    | ácido nonanóico                        | Gramma verde, gordura      | 2174          | 2171           | 60        | 90.3      | (POZO-BAYÓN <i>et al.</i> , 2007) |
| 30.35    | ácido n-decanóico                      | Ranço, gordura             | *             | 2274           | 73        | 94.9      | (REZENDE; FRAGA, 2003)            |
| 31.49    | Ácido 9-decenóico                      | Cera, grama verde, gordura | 2348          | 2340           | 55        | 92.6      | (MAHAJAN <i>et al.</i> , 2004)    |

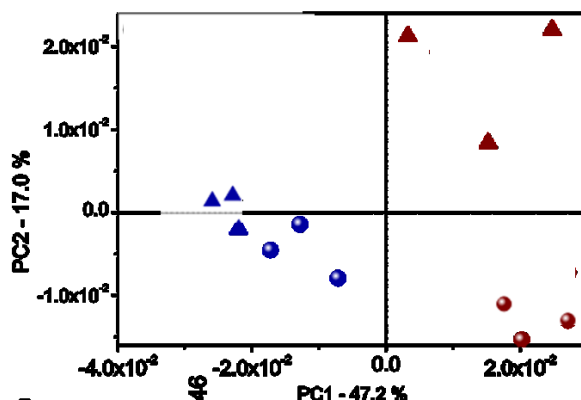
Tempo de retenção: RT; Índice de retenção: RI; Tempos de retenção usando a série n-alcenos (C7-C30) convertidos em constantes independentes; \* não identificado; \*\* A descrição do odor relatada deriva principalmente do banco de dados Flavornet (<http://www.flavornet.org>).

**Figura 5** – Sistema de coordenadas com scores PC1 × PC2 (a) e cargas traçadas em forma de linhas (b) para o núcleo (azul) e superfície (vermelho) do queijo Minas maturado na presença (triângulo) ou ausência (círculo) de ácaros.

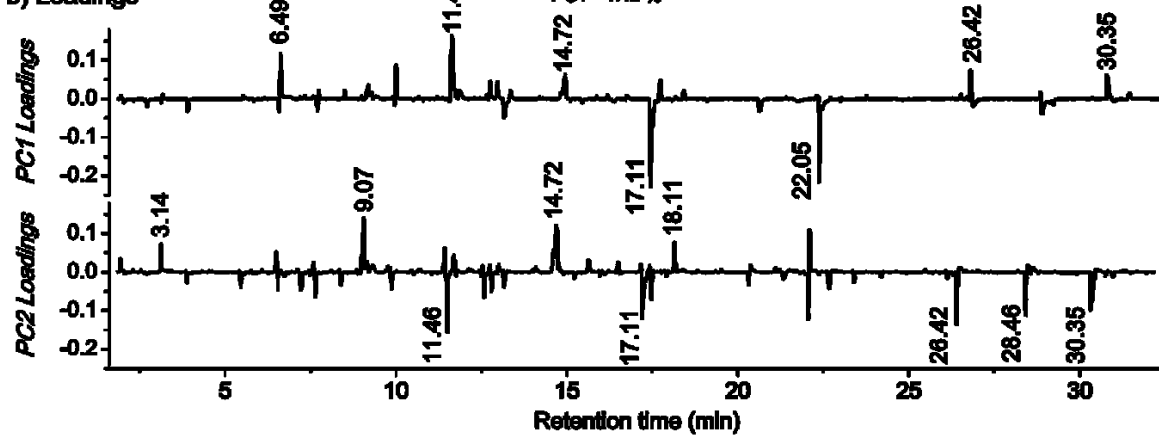


**Figura 6** – PC1 × PC2 com o score de sistema de coordenadas (a) e os carregamentos traçados em forma de linhas (b) para o núcleo (azul) e superfície (vermelho) do queijo Colonial maturado na presença (triângulo) ou ausência (círculo) de ácaros.

**a) Scores**



**b) Loadings**





### 3.4 CONCLUSÕES

O processo de maturação de queijos na presença de ácaros pode ser uma estratégia para a diferenciação do produto. Neste estudo, a presença dos ácaros induziu a produção de metabólitos e COVs que podem conferir identidade sensorial satisfatória aos queijos. As avaliações quimiométricas demonstraram ser ferramentas aplicáveis para apontar diferenças ocasionadas pela presença de ácaros durante a maturação de queijos. Influências semelhantes foram observadas na casca dos queijos Minas e Colonial durante a maturação na presença de ácaros, com identificação de compostos de sabor frutado. Este estudo indicou também que os ácaros podem contribuir para a reação *Maillard* durante a maturação dos queijos, o que conferiu aos produtos uma cor marrom e um sabor de caramelo. Em geral, a presença dos ácaros durante a maturação influenciou na diminuição dos ácidos láctico e graxos e no aumento do glicerol, alanina e ácido cítrico na superfície de ambos os queijos. A análise da presença de ácaros nos queijos sob uma perspectiva ecológica ajuda a explorar a função tecnológica desses organismos ou seus metabólitos na indústria de laticínios.

## 4 DETERMINAÇÃO DA SEGURANÇA DO CONSUMO DE QUEIJOS MATURADOS COM ÁCAROS USANDO CAMUNDONGO SWISS: UMA PROVA DE CONCEITO

### 4.1 INTRODUÇÃO

A maturação de queijos é um processo bioquímico que acarreta alterações de sabores e aromas provocadas por ações enzimáticas de bactérias e fungos (FACCIA *et al.*, 2022; MARCELLINO; BENSON, 2013). Fungos filamentosos, o principal alimento dos ácaros fungívoros, por sua vez, produzem compostos voláteis que os atraem para a superfície dos queijos. Em virtude desta micofagia e diminuição da presença dos fungos na superfície, os ácaros iniciam o consumo do próprio queijo em simbiose com o crescimento de novas hifas de fungos, provocando alterações sensoriais desejáveis no produto como observado por Carvalho *et al.* (2020) e Hubert *et al.* (2004).

A presença dos ácaros em ambientes de maturação de queijos é relatada na literatura tanto como um coadjuvante tecnológico (MELNYK *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2020; ROBINSON *et al.*, 2021), quanto como um problema que gera perdas econômicas (ABBAR *et al.*, 2017; ABOU EL-ATTA *et al.*, 2014; CODEX ALIMENTARIUS, 2003; FDA, 2017; HASAN *et al.*, 2016; STEJSKAL *et al.*, 2015; WILKIN, 1973). Apesar da existência de protocolos de fabricação de queijos maturados com ácaros em países europeus, investigações que descrevem sobre as consequências do consumo deste produto ainda são inexistentes (CARVALHO *et al.*, 2018a).

Indivíduos mais suscetíveis a infecções e toxi-infecções como crianças, idosos e/ou imunossuprimidos, exigem uma maior atenção quanto ao tipo de alimento ingerido, reduzindo-se assim risco de exposição prejudicial (MADAN *et al.*, 2022; MICELI *et al.*, 2011). Estratégias em prol da segurança de alimentos que avaliam a toxicidade de produtos têm sido empregadas usando modelo murino (BRITO *et al.*, 2021; CANGUSSU *et al.*, 2018; CHEN, 2020; FELIX *et al.*, 2019; PULIDO *et al.*, 2020). Modelos murinos não desenvolvem sinais de doença como descrita em humanos ou outros mamíferos; no entanto, eles são importantes, uma

vez que desenvolvem uma infecção aguda e alterações patológicas associadas (BRITO *et al.*, 2021; CANGUSSU *et al.*, 2018; FELIX *et al.*, 2019; SILVESTRE *et al.*, 2014).

Neste contexto, este trabalho visa avaliar parâmetros zootécnicos e hematológicos após alimentação *ad libitum* de camundongos imunossuprimidos para inferir o potencial risco de consumo de queijos maturados com ácaros. Adicionalmente, os resultados podem suportar o avanço da regularização da maturação de queijos na presença de ácaros em países que ainda não possuem este tipo de legislação, como é o caso do Brasil.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Maturação dos queijos e identificação das espécies de ácaros

Queijos Minas Artesanais produzidos na microrregião do cerrado mineiro (Minas Gerais, Brasil) foram maturados na presença e ausência de ácaros autóctones em temperatura ambiente durante 6 meses conforme descrito por Carvalho *et al.* (2020). Os ácaros envolvidos na maturação foram coletados (SisGen 35919-1), montados em lâminas permanentes em meio *Hoyer* e identificados através de análise morfológica utilizando chaves dicotômicas para ácaros *Tyrophagus*, seguindo a metodologia descrita por Carvalho *et al.* (2018b).

### 4.2.2 Exigências éticas/legais e uso de animais em experimentos

Os experimentos com os animais foram realizados de acordo com as diretrizes éticas para experiências em camundongos com protocolos aprovados (nº 23101.002369/20-31) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Tocantins (UFT). Camundongos *Swiss* fêmeas de 6 a 8 semanas de idade e pesando entre 17 e 23 g foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os animais foram mantidos no Laboratório

de Biomoléculas de Vacinas da UFG. Os camundongos foram acondicionados em gaiolas de policarbonato estéreis com medidas de 41 x 34 x 16 cm, com grade para acomodação de ração e água purificada e maravalha autoclavada trocada diariamente. As gaiolas contendo no máximo cinco animais foram mantidos em ambiente a 24 °C, com controle de odor e luz, com fotofase de 12 horas.

Para o experimento foram utilizados animais não imunossuprimidos e animais imunossuprimidos. Os animais foram vermifugados (Ivermectina, Vallee Ranger LA 3,5%, 1:20 em água purificada) por uma semana previamente aos experimentos. Para o estabelecimento do quadro de imunossupressão (animais imunossuprimidos), os camundongos foram submetidos a um tratamento de três doses intraperitoneais de ciclofosfamida (CY) (Genuxal<sup>®</sup>, Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfalen, Alemanha) (150 mg/Kg) por 7 dias a intervalos de 36 horas seguindo a metodologia aplicada por Jin *et al.* (2011). Amostras de sangue foram coletadas para hemograma e análises bioquímicas realizadas em laboratório terceirizado (Pet Shop Dog Veterinary Clinic Center, Gurupi, TO, Brasil).

Uma vez estabelecido o quadro de imunossupressão, grupos de camundongos imunossuprimidos (tratados com CY) foram submetidos ao experimento conjuntamente com grupos de camundongos não imunossuprimidos (não tratados com CY) em gaiolas devidamente identificadas para cada grupo e tipo de tratamento (**Quadro 1**).

**Quadro 1** – Grupos de animais.

| <b>Grupo</b>    | <b>Situação imunológica e alimentação</b>   |
|-----------------|---|
| <b>QsAc</b>     | Não-imunossuprimidos (não tratados com CY) alimentados com casca de queijos maturados sem ácaros          |
| <b>QsAc-i</b>   | Imunossuprimidos (tratados com CY) alimentados com casca de queijos maturados sem ácaros                  |
| <b>QsAm</b>     | Não-imunossuprimidos (não tratados com CY) alimentados com porção interna de queijos maturados sem ácaros |
| <b>QsAm-i</b>   | Imunossuprimidos (tratados com CY) alimentados com porção interna de queijos maturados sem ácaros         |
| <b>QcAc</b>     | Não-imunossuprimidos (não tratados com CY) alimentados com casca de queijos maturados com ácaros          |
| <b>QcAc-i</b>   | Imunossuprimidos (tratados com CY) alimentados com casca de queijos maturados com ácaros                  |
| <b>QcAm</b>     | Não-imunossuprimidos (não tratados com CY) alimentados com porção interna de queijos maturados com ácaros |
| <b>QcAm-i</b>   | Imunossuprimidos (tratados com CY) alimentados com porção interna de queijos maturados com ácaros         |
| <b>Controle</b> | Não-imunossuprimidos (não tratados com CY) alimentados com ração comercial                                |

Os animais foram alimentados diariamente com queijos peletizados maturados na presença ou ausência de ácaros (casca ou porção interna). Os animais foram acompanhados por análises observacionais e medidas de ganho de peso corporal por 13 dias. Os animais foram eutanasiados usando ketamine (300 mg/kg) (Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) e xylazine hydrochloride (22.5 mg/kg) (Syntec, Cotia, SP, Brasil) por via intraperitoneal conforme descrito por Cangussu *et al.* (2018) e Felix *et al.* (2019), com amostragens biológicas seguindo o protocolo aprovado pelo CEUA/UFT. Os animais eutanasiados foram acondicionados em sacos esterilizáveis e entregues a empresa terceirizada para incineração.

#### 4.2.3 Planejamento experimental

O experimento foi organizado seguindo o delineamento inteiramente casualizado. No total 9 grupos (**Quadro 1**) foram estudados, cada qual com cinco animais. Os grupos de animais foram divididos entre os que consumiram queijos maturados com ou sem ácaros (casca e meio). Os animais tratados e não tratados com CY foram estudados separadamente e comparados ao grupo controle. Este grupo controle era composto de animais não imunossuprimidos e tratados com ração comercial (marca Labina para ratos e camundongos).

#### 4.2.4 Hemograma e análises bioquímicas, parâmetros zootécnicos, clínicos, morfológicos

Foram realizadas análises dos parâmetros zootécnicos como consumo de alimentos, ganho de peso corporal e aspectos clínicos e morfológicos de fígado dos camundongos. Quanto ao hemograma, leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina (Hg), hematócito (Ht), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e plaquetas foram avaliados. Quanto as

análises bioquímicas: transaminase oxalacética (TGO), transaminase pirúvica (TGP) e colesterol foram analisados.

#### 4.2.5 Análises dos resultados

A avaliação dos parâmetros zootécnicos, hemograma e análises bioquímicas foi conduzida após o 13º dia de alimentação dos camundongos e os dados médios obtidos foram comparados com a faixa de referência padrão para camundongos *Swiss*. Para os grupos que ficaram fora da faixa de referência uma análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação de médias foram realizados, estes foram comparados ao grupo Controle pelo teste Dunnett com  $\alpha = 5\%$ .

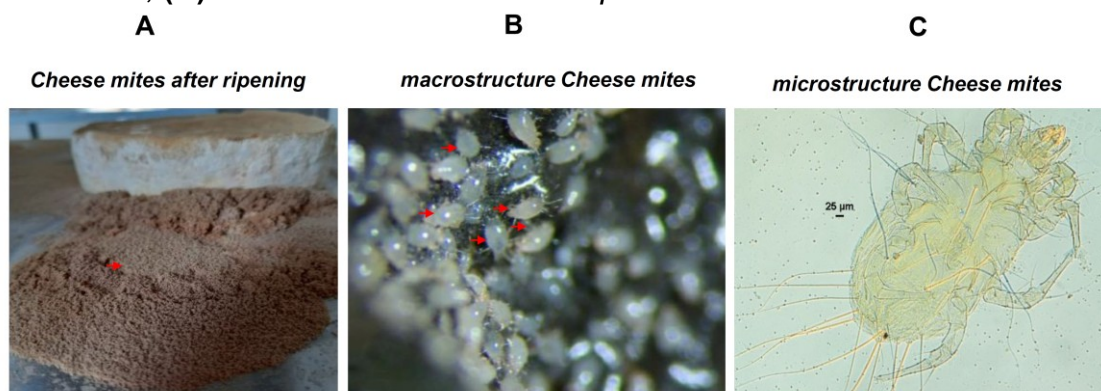
Os dados da avaliação do ganho de peso corporal (13 dias de observação) foram submetidos à análise de regressão, avaliando a significância dos parâmetros do modelo ajustado ( $\alpha = 5\%$ ). O teste Dunnett ( $\alpha = 5\%$ ) foi aplicado para verificar diferença significativa entre os grupos e o grupo Controle.

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Maturação dos queijos e identificação das espécies de ácaros

Os queijos foram maturados com ácaros autóctones e, ao final da maturação de seis meses, foram identificados por análise morfológica, sendo *Tyrophagus putrescentiae* a única espécie identificada nas amostras (**Figura 1**).

**Figura 1** – Ácaros autóctones (*Tyrophagus putrescentiae*) de queijo Minas Artesanal maturado. **(A)** pó fino e marrom composto por ácaros vivos, ácaros mortos, restos de queijo e excrementos retirados após a maturação; **(B)** macroestrutura do ácaro *T. Putrescentiae*; **(C)** microestrutura do ácaro *T. putrescentiae*.



#### 4.3.2 Consumo de alimento e ganho de peso

Aos longo dos 13 dias de avaliação foi verificado um consumo médio 31,12g ( $\pm 8,30$ g) de alimento pelos grupos não tratados com CY, 26,58g ( $\pm 7,64$ g) pelos grupos tratados com CY e 35,31g ( $\pm 6,87$ ) pelo grupo controle. Observou-se que todos os grupos e o controle tiveram tendências de ganho com ajuste linear significativo ( $p \leq 0,05$ ) (**Tabela 1** e **Figura 2**).

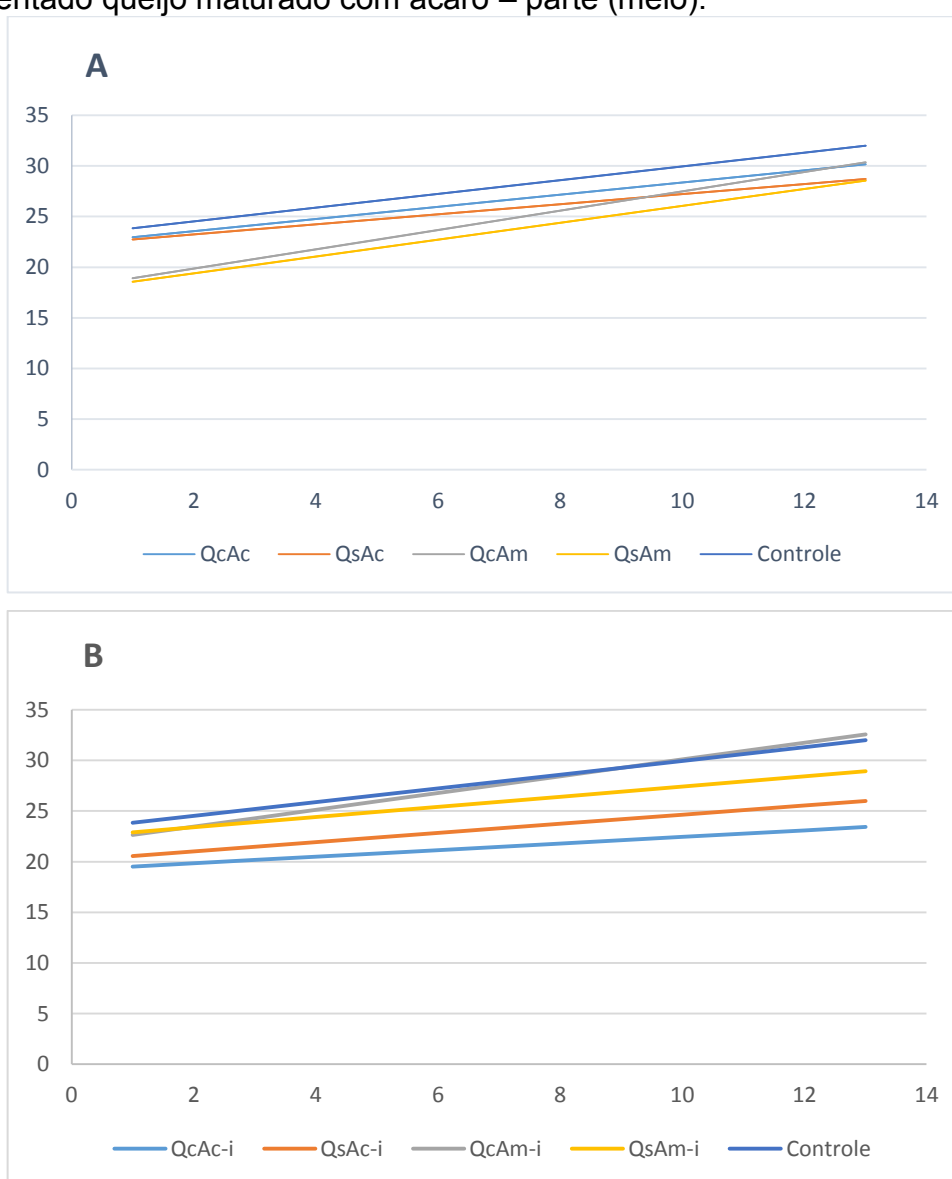
Não houve diferença no ganho de peso (dentro de cada dia) entre os grupos avaliados e o Controle pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade.

**Tabela 1** – Equação linear para o ganho de peso em função do tempo ( $t = n^{\circ}$  dias) de cada grupo de animais. QsAc-i: grupo de camundongos tratados com CY alimentado com queijo maturado sem açúcar – parte (casca); QsAm-i: grupo de camundongos tratados com CY alimentado com queijo maturado sem açúcar – parte (meio); QcAc-i: grupos de camundongo tratados com CY alimentado com queijo maturado com açúcar – parte (casca); QcAm-i: grupos de camundongos tratados com CY alimentado queijo maturado com açaros – parte (meio)

| <b>Grupo</b>    | <b>Modelo Linear</b> |
|-----------------|----------------------|
| <b>QsAc</b>     | $22,2461 + 0,4970t$  |
| <b>QsAc-i</b>   | $20,1126 + 0,4533t$  |
| <b>QsAm</b>     | $17,9433 + 0,9545$   |
| <b>QsAm-i</b>   | $21,8141 + 0,8273t$  |
| <b>QcAc</b>     | $22,3611 + 0,5995t$  |
| <b>QcAc-i</b>   | $19,1962 + 0,3246t$  |
| <b>QcAm</b>     | $17,9433 + 0,9545$   |
| <b>QcAm-i</b>   | $21,8141 + 0,8273t$  |
| <b>Controle</b> | $23,1652 + 0,6792t$  |



**Figura 2** – Ajuste dos valores preditos pelo modelo linear para o ganho de peso (g) ao longo de 13 dias de camundongos alimentados com queijos maturados e grupo Controle alimentado somente com ração comercial: **(A)** QsAc: grupo de camundongos não tratados com CY alimentado com queijo maturado sem açúcar – parte (casca); QsAm: grupo de camundongos não tratados com CY alimentado com queijo maturado sem açúcar – parte (meio); QcAc: grupos de camundongo não tratados com CY alimentado com queijo maturado com açúcar – parte (casca); QcAm: grupos de camundongos não tratados com CY alimentado com queijo maturado com açúcar – parte (meio); **(B)** QsAc-i: grupo de camundongos tratados com CY alimentado com queijo maturado sem açúcar – parte (casca); QsAm-i: grupo de camundongos tratados com CY alimentado com queijo maturado sem açúcar – parte (meio); QcAc-i: grupos de camundongo tratados com CY alimentado com queijo maturado com açúcar – parte (casca); QcAm-i: grupos de camundongos tratados com CY alimentado com queijo maturado com açúcar – parte (meio).



#### 4.3.3 Parâmetros zootécnicos, hemograma, análises bioquímicas e análises morfológicas de fígados de camundongos não tratados com CY (não imunossuprimidos)

Ao longo dos 13 dias de experimentação usando animais não tratados com CY e alimentados com queijos maturados com e sem ácaros (casca e meio) foram observadas características desejáveis de animais saudáveis, seja pelo crescente ganho de peso corporal, qualidade de pêlos lisos, agilidade de movimentos e consumo de alimentos. Nestes aspectos, grupos alimentados com queijos maturados (casca ou porção interna) na presença ou ausência de ácaros não diferiram entre si, bem como, com animais alimentados com ração comercial (**Tabela 2**). Resultados hematológicos dos grupos experimentais revelaram que não houve diferença entre animais alimentados com queijos maturados e o grupo Controle para leucócitos totais, eritrócitos, Hg, Ht, HCM, CHCM e plaquetas ( $p > 0,05$ ), diferindo apenas quanto ao nível de Hb (8,77(1,8) g/dL) referente a alimentação de animais usando porção interna do queijo maturado na presença de ácaros (QcAm) ( $p \leq 0,05$ ) (**Tabela 4**). Os resultados revelaram maior TGO ( $p \leq 0,05$ ) em animais alimentados com a casca de queijos maturados na ausência de ácaros (QsAc) e com a porção interna de queijos maturados na presença de ácaros (QcAm) em comparação ao grupo Controle (**Tabela 4**). Resultados de TGP revelaram que somente grupo de animais alimentados com a casca de queijos maturados na ausência de ácaros (QsAc) diferiram do grupo Controle ( $p \leq 0,05$ ) (**Tabela 4**), enquanto que, dados de colesterol, demonstraram que todos os grupos alimentados com queijos maturados na ausência e presença de ácaros, casca ou porção interna apresentando índices mais elevados que o grupo Controle ( $p \leq 0,05$ ) (**Tabela 4**). Aspectos morfológicos de fígados e pesos demonstraram que os grupos não diferiram do grupo Controle ( $p > 0,05$ ), revelando normalidade, com ausência de lesões, inchaço e vermelhidões (**Figura 3 e Tabela 2**).

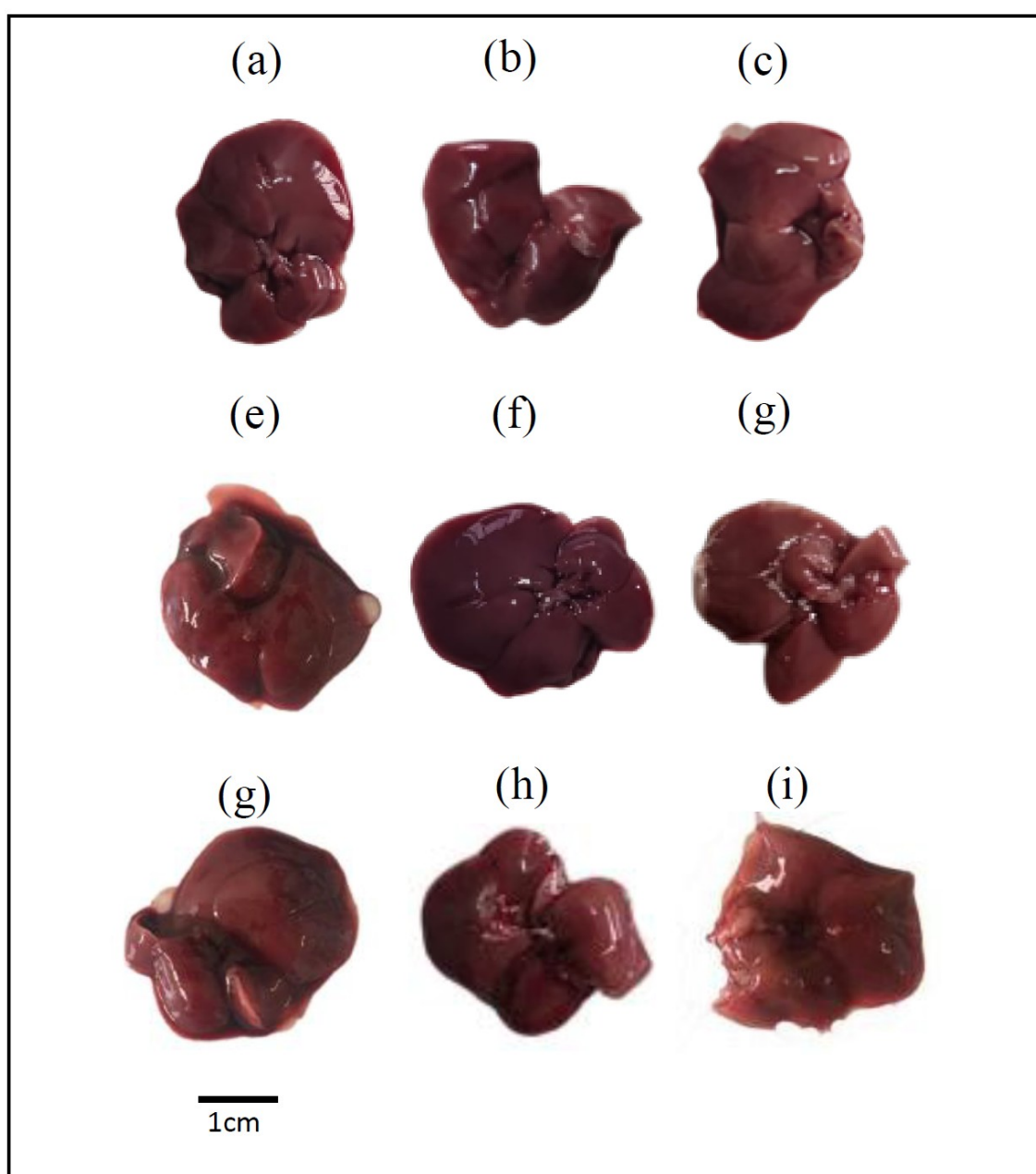
**Tabela 2** – Aspectos clínicos de camundongos não imunossuprimidos (não tratados com CY) alimentados com queijos maturados na presença ou ausência de ácaros e camundongos alimentados somente com ração (grupo Controle) no 1º (D1) e no último dia (D13) de consumo e peso (g) médio de fígado no último dia (D13). QsAc: grupo de camundongos não tratados com CY alimentado com queijo maturado sem ácaro – parte (casca); QsAm: grupo de camundongos não tratados com CY alimentado com queijo maturado sem ácaro – parte (meio); QcAc: grupos de camundongos não tratados com CY alimentado com queijo maturado com ácaro – parte (casca); QcAm: grupos de camundongos não tratados com CY alimentado com queijo maturado com ácaro – parte (meio); a: não se diferenciaram estatisticamente em relação ao controle (teste Dunnet 5%)

| <b>Aspectos Clínicos</b>         | <b>QsAc</b>           |            | <b>QsAm</b>           |            | <b>QcAc</b>           |            | <b>QcAm</b>           |            | <b>Controle</b>       |            |
|----------------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|
|                                  | <b>D1</b>             | <b>D13</b> | <b>D1</b>             | <b>D13</b> | <b>D1</b>             | <b>D13</b> | <b>D1</b>             | <b>D13</b> | <b>D1</b>             | <b>D13</b> |
| Pelo arrepiado                   | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Queda pelo                       | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Escurecimento cauda              | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Respiração rápida                | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Agitação                         | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Espasmo                          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Morte                            | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Inchaço corpo                    | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Ganho de peso                    | -                     | +          | -                     | +          | -                     | +          | -                     | +          | -                     | +          |
| <b>Peso (g) médio fígado D13</b> | 1,4523                |            | 1,4363                |            | 1,7002                |            | 1,5839                |            | 1,7798                |            |
|                                  | (0,0862) <sup>a</sup> |            | (0,0376) <sup>a</sup> |            | (0,4021) <sup>a</sup> |            | (0,1429) <sup>a</sup> |            | (0,1662) <sup>a</sup> |            |

**Tabela 4** – Dados médios (desvio-padrão) das análises bioquímicas e hemograma dos camundongos não imunossuprimidos não tratados com CY alimentados com queijos maturados na presença e ausência de ácaros e de camundongos alimentados somente com ração (grupo Controle) no último dia (13<sup>o</sup>) de consumo. QsAc: grupo de camundongos não tratados com CY alimentado com queijo maturado sem ácaro – parte (casca); QsAm: grupo de camundongos não tratados com CY alimentado com queijo maturado sem ácaro – parte (meio); QcAc: grupos de camundongo não tratados com CY alimentado com queijo maturado com ácaro – parte (casca); QcAm: grupos de camundongos não tratados com CY alimentado com queijo maturado com ácaro – parte (meio); a (em linha): não se diferenciaram estatisticamente em relação ao controle e b (em linha): se diferenciaram estatisticamente em relação ao grupo Controle (teste Dunnet  $\alpha = 5\%$ ); Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; Hemoglobina corpuscular média: HCM; Concentração de hemoglobina corpuscular média: CHCM; Transaminase oxalacética: TGO; Transaminase pirúvica: TGP.

| <b>Ensaio clínico</b>           | <b>QsAc</b>             | <b>QsAm</b>             | <b>QcAc</b>             | <b>QcAm</b>             | <b>Controle</b>      | <b>Referencial</b> |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------|
| Leucócitos totais               | 6266(808)               | 6200(721)               | 5966,7(737)             | 5633,3(208)             | 7600(179)            | 4300-10000         |
| Eritrócitos                     | 6,93(0,8)               | 5,53(0,7)               | 5,5(0,53)               | 4,37(0,7)               | 5,08(0,5)            | 4,3-6,0            |
| Hb (g/dL)                       | 13,97(2) <sup>a</sup>   | 11,07(1) <sup>a</sup>   | 11,07(1) <sup>a</sup>   | 8,77(1,8) <sup>b</sup>  | 12(0,6) <sup>a</sup> | 12-17              |
| Ht (%)                          | 42(5)                   | 33,33(4)                | 33,33(3)                | 26,33(5)                | 39,17(0,8)           | 30-45              |
| HCM (pg)                        | 20,13(0)                | 20,13(0)                | 20,13(0)                | 20,07(0)                | 23,33(2)             | 19-23              |
| CHCM (g/dL)                     | 33,27(0)                | 33,27(0)                | 33,27(0)                | 33,27(0)                | 30,78(2)             | 32-36              |
| Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μl) | 397,33(46)              | 388(71)                 | 352,67(17)              | 384(139)                | 296,17(38)           | 200-830            |
| TGO (U/L)                       | 265,33(10) <sup>b</sup> | 174,67(30) <sup>a</sup> | 208,67(14) <sup>a</sup> | 201,67(33) <sup>a</sup> | 171(13) <sup>a</sup> | 81-184             |
| TGP (U/L)                       | 111(24) <sup>b</sup>    | 65(20) <sup>a</sup>     | 79,33(15) <sup>a</sup>  | 80,67(18) <sup>a</sup>  | 54(7) <sup>a</sup>   | 26-60              |
| Colesterol Total (mg/dL)        | 188(3) <sup>b</sup>     | 182(24) <sup>b</sup>    | 171,33(19) <sup>b</sup> | 155(29) <sup>b</sup>    | 99(8) <sup>a</sup>   | 84-145             |

**Figura 3** – Fígados de camundongos alimentados de queijos maturados na presença e ausência de ácaros e de camundongos alimentados somente com ração (grupo controle). (a) camundongos não tratados com CY alimentados com casca de queijos maturados na presença de ácaros; (b) camundongos tratados com CY alimentados com casca de queijos maturados com ácaros; (c) camundongos não tratados com CY alimentados com porção interna de queijos maturados com ácaros; (d) camundongos tratados com CY alimentados com porção interna de queijos maturados com ácaros; (e) camundongos não tratados com CY alimentados com casca de queijos maturados sem ácaros; (f) camundongos tratados com CY alimentados com casca de queijos maturados sem ácaros; (g) camundongos não tratados com CY alimentados com porção interna de queijos maturados sem ácaros; (h) camundongos tratados com CY alimentados com porção interna de queijos maturados sem ácaros; (i) controle.



#### 4.3.4 Parâmetros zootécnicos, hemograma, análises bioquímicas e morfológicas de fígados de camundongos tratados com CY (imunossuprimidos)

Foi observado nos animais que inicialmente manifestavam sinais clínicos de debilidade na saúde (pêlo arrepiado, queda de pêlo, respiração rápida, espasmos e inchaços no corpo) uma reversão da imunossupressão, revelada pelo ganho de peso ao longo do tempo, melhoria da qualidade dos pêlos, agilidade nos movimentos e consumo de alimentos (**Tabela 3**). Resultados hematológicos e bioquímicos também comprovaram a reversão da imunossupressão. Animais alimentados com queijos maturados (casca ou porção interna) apresentaram desenvolvimento animal e níveis semelhantes de leucócitos totais, eritrócitos, Hg, Ht, HCM, CHCM, plaquetas e TGO, em comparação ao grupo Controle ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 5**). Foi observado que grupos de animais alimentados com a casca ou porção interna de queijos maturados na presença de ácaros (QcAc-i e QcAm-i) apresentaram níveis mais elevados de TGP em comparação ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ) (**Tabela 5**). Para os dados de colesterol, todos os grupos apresentaram níveis superiores em comparação ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ) (**Tabela 5**). Aspectos morfológicos e peso de fígado demonstraram que os grupos não diferiram entre si com relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). Os resultados revelaram que alimentação utilizando queijos maturados na presença ou ausência de ácaros não é só aparentemente inócua, como proporciona desenvolvimento animal e reversão de aspectos de imunossupressão. Isto demonstra a potencial segurança do alimento para consumo humano. Os resultados satisfatórios de ausência de lesões, inchaço e vermelhidões nos fígados destes animais corroboram com essa demonstração (**Figura 3 e Tabela 3**).

**Tabela 3** – Aspectos clínicos de camundongos imunossuprimidos (tratados com CY) alimentados com queijos maturados na presença ou ausência de ácaros e camundongos alimentados somente com ração (grupo controle) no 1º (D1) e no último dia (D13) de consumo e peso (g) médio de fígado no último dia (D13). QsAc-i: grupo de camundongos tratados com CY alimentado com queijo maturado sem ácaro – parte (casca); QsAm-i: grupo de camundongos tratados com CY alimentado com queijo maturado sem ácaro – parte (meio); QcAc-i: grupos de camundongo tratados com CY alimentado com queijo maturado com ácaro – parte (casca); QcAm-i: grupos de camundongos tratados com CY alimentado queijo maturado com ácaro – parte (meio); a: não se diferenciaram estatisticamente em relação ao controle (teste Dunnet 5%)

| <b>Aspectos Clínicos</b>         | <b>QsAc-i</b>         |            | <b>QsAm-i</b>         |            | <b>QcAc-i</b>         |            | <b>QcAm-i</b>         |            | <b>Controle</b>       |            |
|----------------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|
|                                  | <b>D1</b>             | <b>D13</b> | <b>D1</b>             | <b>D13</b> | <b>D1</b>             | <b>D13</b> | <b>D1</b>             | <b>D13</b> | <b>D1</b>             | <b>D13</b> |
| Pelo arrepiado                   | +                     | -          | +                     | -          | +                     | -          | +                     | -          | -                     | -          |
| Queda pelo                       | +                     | -          | +                     | -          | +                     | -          | +                     | -          | -                     | -          |
| Escurecimento cauda              | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Respiração rápida                | +                     | -          | +                     | -          | +                     | -          | +                     | -          | -                     | -          |
| Agitação                         | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Espasmo                          | +                     | -          | +                     | -          | +                     | -          | +                     | -          | -                     | -          |
| Morte                            | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          | -                     | -          |
| Inchaço corpo                    | +                     | -          | +                     | -          | +                     | -          | +                     | -          | -                     | -          |
| Ganho de peso                    | -                     | +          | -                     | +          | -                     | +          | -                     | +          | -                     | +          |
| <b>Peso (g) médio fígado D13</b> | 1,6985                |            | 1,4821                |            | 1,8340                |            | 1,3306                |            | 1,7798                |            |
|                                  | (0,3195) <sup>a</sup> |            | (0,3029) <sup>a</sup> |            | (0,1655) <sup>a</sup> |            | (0,1064) <sup>a</sup> |            | (0,1662) <sup>a</sup> |            |

**Tabela 5** – Dados médios (desvio-padrão) das análises bioquímicas e hemograma dos camundongos imunossuprimidos (tratados com CY) alimentados de queijos maturados com e sem ácaros (casca e meio) e camundongos alimentados somente com ração (controle) no último dia (13<sup>o</sup>) de consumo. QsAc-i: grupo de camundongos tratados com CY alimentado com queijo maturado sem ácaro – parte (casca); QsAm-i: grupo de camundongos tratados com CY alimentado com queijo maturado sem ácaro – parte (meio); QcAc-i: grupos de camundongo tratados com CY alimentado com queijo maturado com ácaro – parte (casca); QcAm-i: grupos de camundongos tratados com CY alimentado queijo maturado com ácaros – parte (meio); a (em linha): não se diferenciaram estatisticamente em relação ao grupo Controle (teste Dunnet 5%); b (em linha): se diferenciaram estatisticamente em relação ao grupo Controle (teste Dunnet 5%); Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; Hemoglobina corpuscular média: HCM; Concentração de hemoglobina corpuscular média: CHCM; Transaminase oxalacética: TGO; Transaminase pirúvica: TGP.

| Ensaio clínico                  | QsAc-i                  | QsAm-i                  | QcAc-i                  | QcAm-i                  | Controle             | Referencial |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|-------------|
| Leucócitos totais               | 7700(300)               | 5700(900)               | 5500(265)               | 5500(265)               | 7600(179)            | 4300-10000  |
| Eritrócitos                     | 6(0,5)                  | 5,33(1)                 | 5,13(0,98)              | 5,47(0,35)              | 5,08(0,5)            | 4,3-6,0     |
| Hb (g/dL)                       | 12(1) <sup>a</sup>      | 10,67(2) <sup>a</sup>   | 10,3(2) <sup>a</sup>    | 10,97(0,7) <sup>a</sup> | 12(0,6) <sup>a</sup> | 12-17       |
| Ht (%)                          | 36(3)                   | 32(6)                   | 31(6)                   | 33(2)                   | 39,17(0,8)           | 30-45       |
| HCM (pg)                        | 20,13(0)                | 20,13(0)                | 20,07(0)                | 20,07(0)                | 23,33(2)             | 19-23       |
| CHCM (g/dL)                     | 33,27(0)                | 33,27(0)                | 33,27(0)                | 33,07(0)                | 30,78(2)             | 32-36       |
| Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μl) | 436(108)                | 356,67(78)              | 485(166)                | 329(75)                 | 296,17(38)           | 200-830     |
| TGO (U/L)                       | 178(42) <sup>a</sup>    | 193,67(48) <sup>a</sup> | 232,33(9) <sup>a</sup>  | 255,67(31) <sup>b</sup> | 171(13) <sup>a</sup> | 81-184      |
| TGP (U/L)                       | 53,67(13) <sup>a</sup>  | 63(8) <sup>a</sup>      | 119(36) <sup>b</sup>    | 109(16) <sup>b</sup>    | 54(7) <sup>a</sup>   | 26-60       |
| Colesterol Total (mg/dL)        | 143,33(21) <sup>b</sup> | 158,33(7) <sup>b</sup>  | 149,67(29) <sup>b</sup> | 153(9,8) <sup>b</sup>   | 99(8) <sup>a</sup>   | 84-145      |

#### 4.4 DISCUSSÃO

A maturação de queijos na presença de ácaros é um processo tecnológico estabelecido em alguns países, em especial na Europa, onde é comum encontrar este tipo de produto sendo comercializado (MELNYK *et al.*, 2010; ROBINSON *et al.*, 2021). Neste trabalho, o ácaro presente nos queijos maturados foi identificado como *T. putrescentiae*. Este resultado reforça a prevalência desta espécie em queijos brasileiros infestados por ácaros (CARVALHO *et al.*, 2018b, 2020), diferindo das espécies *Acarus siro* e *Tyrollichus casei* comumente encontradas na Europa como coadjuvantes tecnológicos na produção de queijos (MELNYK *et al.*, 2010). No entanto, *T. putrescentiae* pode ser encontrado em todo o globo terrestre, o que faz com que o resultado deste trabalho seja importante para diversos países produtores de queijos (CARVALHO *et al.*, 2018a; 2018b, 2020).



Os resultados indicaram que este o queijo maturado na presença de ácaro *T. putrescentiae* é potencialmente seguro por proporcionar ganhos de peso sem evidências de sinais de enfermidades nas cobaias testadas. Verificou-se que a presença do ácaro durante a maturação dos queijos não influenciou no ganho ou perda de peso, o qual se manteve crescente em todos os grupos, mesmo que em algum momento o consumo diário tenha apresentado uma ligeira diminuição em todos os grupos, o que pode ser atribuído ao próprio desenvolvimento animal alimentado com queijo que possui contribuição nutricional, suprimindo suas demandas energéticas (RAVUSSIN *et al.*, 2018).

Modelos murinos, como o utilizado neste trabalho, têm sido empregados para a elucidação de inocuidade de alimentos e desenvolvimento de produtos funcionais na indústria de alimentos. Joh *et al.*(2013) e Meng *et al.* (2018) relataram que, ao administrarem os microrganismos probióticos *Lactocaseibacillus casei* HY7213 e *Lactiplantibacillus plantarum* KLDS1.0318, respectivamente, em camundongos imunossuprimidos tratados com CY, também obtiveram reversão da imunossupressão. Produtos fermentados produzidos a partir de leite cru, como é o caso do queijo Minas Artesanal utilizado neste estudo, também é fonte de microrganismos potencialmente probióticos ou de seus metabólitos (BARZEGAR *et al.*, 2021; DORES *et al.*, 2013), além de possuírem inúmeros compostos benéficos para a saúde, como cálcio, proteína, substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias, o que também pode ter contribuído com a reversão da imunossupressão (IWANIAK; MOGUT, 2020; KIM *et al.*, 2021).

A análise de imunossupressão em cobaias é determinante para validar a inocuidade de alimentos. Os hemogramas de animais alimentados com queijos maturados revelaram discreta alteração hematológica, entretanto, esses dados não demonstraram uma relação direta do consumo de queijos na presença ou ausência de ácaros, podendo estar ligada a condições do tratamento com CY e o restabelecimento do quadro de imunossupressão, ou mesmo associada à alimentação não saudável exclusiva de queijos (DA SILVA OLIVEIRA; SILVA-AMPARO, 2018). Esta condição está confirmada pelos índices de colesterol acima da normalidade em todos os camundongos alimentados com queijos como demonstrado por Kim *et al.* (2021). A saudabilidade dos animais pode ser

confirmada pela aparência visual (**Figura 3**) e peso dos fígados (**Tabela 2 e Tabela 3**), demonstrando que os tratamentos não acarretaram aparentemente problemas hepáticos com lesão, inchaço ou vermelhidão no órgão e com o peso dentro da normalidade em comparação ao grupo controle.

Apesar da relevância dos dados obtidos, o estudo de segurança para o consumo usando camundongos tratados com CY ainda necessita maiores elucidações. Mesmo demonstrando a relevância da alimentação no desenvolvimento destes camundongos que proporcionou a reversão deste quadro, investigação futura das frações do colesterol (HDL - *high density lipoprotein* e LDL - *low density lipoproteins*) precisa ser conduzida tendo em vista os benefícios do consumo de queijo na relação triglicérides/colesterol (MENA-SÁNCHEZ *et al.*, 2018). Além disso, seria relevante uma investigação com maior período de consumo destes queijos especialmente para estes grupos tratados com CY. Porém, vale ressaltar que, queijos em geral, são alimentos processados e possuem recomendação diária moderada de consumo (DA SILVA OLIVEIRA; SILVA-AMPARO, 2018).

#### 4.5 CONCLUSÃO

A presença de ácaros durante a maturação dos queijos não influenciou negativamente na saúde dos indivíduos que se alimentaram deste produto em comparação aos indivíduos que se alimentaram de queijos maturados na ausência de ácaros e em comparação ao grupo controle. Nos grupos de camundongos tratados com CY a imunossupressão foi revertida após o consumo exclusivo de queijos maturados na presença ou ausência de ácaros. O estudo demonstrou que o consumo de queijos maturados na presença de ácaros *T. putrescentiae* é potencialmente seguro em queijos e passível de ser legalizado. Apesar do estudo ter tido um enfoque com uso intencional e em grande quantidade de ácaros com o objetivo de coadjuvante tecnológico, seus resultados podem ser extrapolados ao problema existente e recorrente em indústrias lácteas que maturam queijos e que são infestadas por ácaros, podendo-se concluir que, o produto infestado, após sua limpeza, demonstra potencial segurança para o consumo.

## 5 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA MICROBIOTA DOS ÁCAROS PRESENTES NA MATURAÇÃO DE QUEIJOS COM A MICROBIOTA DO PRODUTO FINAL

### 5.1 INTRODUÇÃO

Ácaros são organismos pertencentes ao Filo Artrópoda e possuem algumas características comuns aos insetos como a presença de exoesqueleto quitinoso e pernas articuladas (FLECHTMANN, 1986). Estão presentes naturalmente em diversos ambientes incluindo os ambientes de maturação de queijo. Os ácaros, quando micófitos, possuem os fungos como sua principal fonte de alimentação e, por essa razão, são atraídos pelos fungos que se desenvolvem nas superfícies dos queijos durante o período de maturação (CARVALHO *et al.*, 2018a).

Estudo realizado por Carvalho *et al.* (2018b) constatou que ácaros presentes nos queijos brasileiros diferem dos ácaros dos queijos de outros países identificados na literatura como coadjuvantes de fabricação (MELNYK *et al.*, 2010) o que demonstra a necessidade de um maior entendimento da presença dessas espécies na tecnologia destes queijos.

A presença destes aracnídeos durante a maturação, em conjunto com o ecossistema existente nos queijos, mostrou-se benéfica para o produto final do ponto de vista sensorial (CARVALHO *et al.*, 2020), pois verificou-se em dois tipos de queijos maturados na presença de ácaros uma maior quantidade de compostos que conferiam ao produto um sabor frutado e adocicado, característico de caramelo. Compostos potencialmente nocivos a saúde humana não foram identificados. No entanto, o consumo de um alimento que utiliza organismos vivos em seus processos tecnológicos (CARVALHO *et al.*, 2018a) requer maiores elucidações, especialmente quanto à segurança microbiológica.

Com este propósito, o objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre a microbiota presente no intestino dos ácaros e a microbiota presente no queijo, tanto na superfície (casca) quanto na região central (meio) e inferir os seus potenciais riscos ou benefícios.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 Maturação de queijos com ácaros e identificação das espécies de ácaros presentes)

Duas amostras de queijo Minas Artesanal produzidos na região do cerrado mineiro (Minas Gerais, Brasil) foram maturados com ácaros autóctones durante 6 meses conforme descrito por Carvalho *et al.* (2020). Os queijos foram produzidos a partir do mesmo lote de leite e maturados no mesmo ambiente. As espécies de ácaros presentes nos queijos maturados foram identificadas conforme descrito por Carvalho *et al.* (2018b).

A identificação taxonômica das espécies de ácaros presentes nos queijos maturados foi executada utilizando chave de identificação taxonômica, conforme descrito por Carvalho *et al.* (2018b).

### 5.2.2 Extração de DNA da microbiota bacteriana dos queijos maturados

Dos queijos maturados com ácaros foram coletadas 1 g de amostra a partir de raspas de diferentes partes da superfície/casca (codificação das amostras: C1 e C2) e do meio do queijo (codificação das amostras: M1 e M2) e dissolvidas em 15 mL de citrato de sódio a 2% (m/vol). Estes foram enviados para a empresa Neopropecta (Florianópolis, Brasil) onde foi realizada a extração do DNA total usando “beads” magnéticas e um tampão de lise a base de tiocianato de guanidina (CHRISTOFF *et al.*, 2017) e sequenciado de acordo com os protocolos da plataforma Illumina, utilizando como marcador molecular regiões variáveis do gene ribossomal 16S (KAZUMASA FUKUDA, MIDORI OGAWA, 2016).

### 5.2.3 Extração de DNA da microbiota bacteriana presente no sistema digestório dos ácaros

Um *pool* de ácaros (em torno de 500) presentes nos queijos maturados com ácaros foram coletados (codificação das amostras: A1 e A2) e usados para extração de DNA total utilizando o QIAmp® DNA Micro Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante para o protocolo de extração de DNA de tecidos. Antes da extração de DNA, os ácaros foram lavados cinco vezes em tampão PBS-T (Tampão fosfato salino acrescido de 0,5% de Tween 20) para antissepsia externa do organismo (HUBERT *et al.*, 2012). A quantidade e qualidade do DNA total extraído foram verificados em espectrofotômetro Nanodrop (Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer – Modelo PICOPET01 – In-Tip Methodology). Este DNA total, que contém principalmente o DNA da microbiota bacteriana presente no sistema digestório dos ácaros, foi igualmente enviado para a empresa Neopropecta para sequenciamento usando a mesma plataforma e marcador usado para a microbiota do queijo (seção 2.2).

### 5.2.4 Amplificação do RNA ribossomal 16S, construção da biblioteca e sequenciamento

O DNA total de cada amostra de queijo e dos ácaros foi usado para amplificar, via PCR, um fragmento do gene de RNA ribossomal 16S, que contém a região hipervariável V3-V4, a qual tem uma ampla cobertura taxonômica em bactérias e arqueobactérias contribuindo para sua identificação (WANG; QIAN, 2009). Posteriormente, a construção da biblioteca foi feita em duas etapas que também envolvem reações de PCR. Na primeira etapa (PCR1) foram ligados adaptadores aos fragmentos do 16S amplificados, e na segunda etapa (PCR2) são ligadas sequências indexadoras, que permitem a identificação das amostras. As reações de PCR para construção da biblioteca foram feitas usando Taq Platinum (Invitrogen, USA). As condições de amplificação da PCR 1 foram: 95°C for 5 min, 25 ciclos de 95°C for 45s, 55°C por 30s e 72°C for 45s e uma etapa de extensão final de 72°C

por 2 min. Para a PCR 2 foram: 95°C por 5 min, 10 ciclos de 95°C por 45s, 66°C por 30s e 72°C por 45s e uma etapa de extensão final de 72°C por 2 min. A reação de PCR final das amostras foi purificada usando AMPureXP beads (Beckman Coulter, Brea, CA). As bibliotecas foram quantificadas e sequenciadas em um sistema MiSeq usando primers do kit Illumina (CHRISTOFF *et al.*, 2017). Todas essas etapas foram realizadas na empresa Neopropecta.

### 5.2.5 Análises metataxonômicas

A qualidade das sequências brutas foi analisada usando o programa Trimmomatic (BOLGER *et al.*, 2014). As amostras A1, C2, M1 e M2 foram analisadas em *paired end*, ou seja, ambos os arquivos *forward* e *reverse* foram avaliados. Já as amostras A2 e C1 foram analisadas em *single end*, ou seja, apenas uma sequência foi levada em consideração para a análise da qualidade das sequências. O valor de *phred* adotado foi 33. Os parâmetros usados na análise foram: *illuminaclip*, remove a sequência clássica dos *barcodes*; *leading*, remove as três primeiras e as três últimas bases de cada sequência; e *slidingwindow 4:30*, que remove as sequências com *phred* menor que 30. A amostra A1 apresentou 74,83% de sequências recuperadas após a filtragem de qualidade; a amostra C2 apresentou 74,88% de sequências recuperadas; a amostra M1 apresentou 72,84% de sequências recuperadas e a amostra M2 apresentou 75,73% de sequências de boa qualidade que foram recuperadas e salvas após a filtragem de qualidade. Já para as amostras analisadas em *single end*, apresentaram recuperação de 95,08% de sequências de boa qualidade para a amostra A2; 95,86% de sequências recuperadas para a amostra C1.

Posteriormente, as amostras foram processadas usando o software DADA2 versão 3.11 no RStudio versão 4.0.0, seguindo a estratégia descrita por Callahan *et al.* (2016). As *reads* R1 e R2 foram truncadas para um comprimento de 150 pb, e as *reads* de baixa qualidade foram removidas. Usando aprendizado de máquina, os erros das *reads* foram identificados e em seguida removidos. As *reads* R1 e R2 foram unidas usando DADA2 :: *mergePairs* e as quimeras foram removidas usando

DADA2 :: removeBimeraDenov. A atribuição taxonômica foi realizada usando o banco de dados SILVA v132, em seis níveis taxonômicos (QUAST *et al.*, 2013). As análises da comunidade microbiana das amostras foram executadas em seguida usando o Phyloseq 1.24.2 (MCMURDIE; HOLMES, 2013), também no RStudio. Os táxons com classificação taxonômica atribuída como “*Mitochondria*” e “*Chloroplast*” foram removidos.

#### 5.2.6 Análise da diversidade microbiana

A diversidade Alfa foi estimada para cada amostra pelo cálculo dos índices de diversidade de Chao, Simpson e Shannon usando o phyloseq :: plot\_richness no RStudio. Para a comparação do microbioma entre as amostras, a diversidade Beta foi realizada pela análise multidimensional NMDS (*Non-Metric Multidimensional Scaling*) com base na presença e ausência de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) usando a distância de *Jaccard* com o pacote phyloseq :: ord.nm.ds.bray. Os gráficos de barras foram construídos para apresentar os táxons mais abundantes, usando phyloseq :: prune\_taxa.

#### 5.2.7 Análises estatísticas

Os gráficos, análises multivariadas e estatísticas foram construídos usando o software RStudio, com o pacote ggplot2 (Wickham and Winston, 2008) e GraphPad Prism 8.0.2. Inicialmente, a análise da distribuição de dados foi realizada utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov. Após confirmar o perfil de distribuição Gaussiano dos dados, foi utilizada uma ANOVA unidirecional para comparar o índice de diversidade e a abundância relativa de OTUs no nível do gênero, seguida pelo teste de Tukey com  $\alpha = 5\%$ .

### 5.3 RESULTADOS

A única espécie de ácaro identificada nas amostras de queijos maturados foi *Tyrophagus putrescentiae* (**Figura 1**).

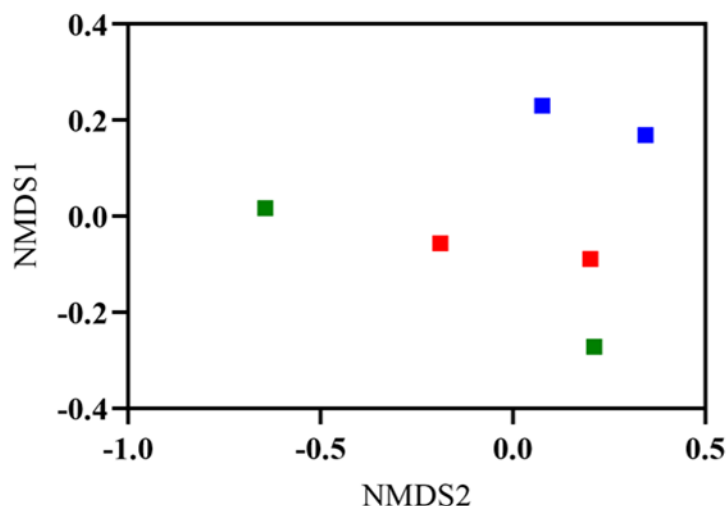
**Figura 1** - *Tyrophagus putrescentiae* identificado em amostras de queijos maturados



Pela distância de Jaccard pôde-se observar que as replicatas biológicas apresentaram boa qualidade em razão de suas proximidades (significando similaridade) no gráfico disposto na **Figura 2**. As replicatas da casca do queijo foram as que mais se distanciaram entre si no gráfico (menos similares) e as replicatas do meio do queijo as que menos se distanciaram (mais similares). Observou-se que a microbiota bacteriana intestinal do ácaro é intermediária à microbiota bacteriana da casca e do meio do queijo compartilhando dois táxons ao nível de gênero com cada uma destas partes do queijo.

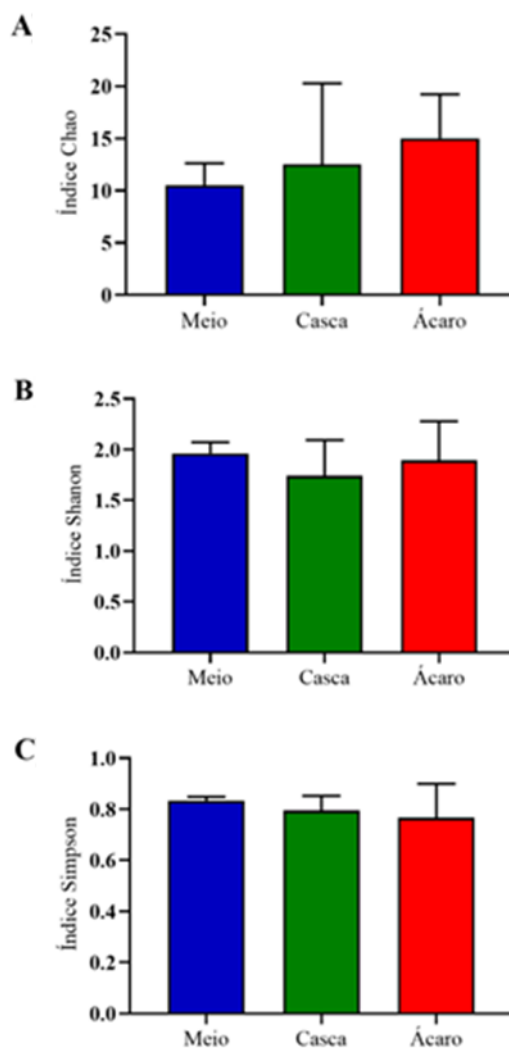


**Figura 2** - Projeção das amostras em gráfico de escalonamento multidimensional (NMDS) calculados utilizando a distância de Jaccard. As cores representam as diferentes amostras analisadas, meio do queijo (azul), casca do queijo (verde) e microbiota intestinal do ácaro (vermelho).



Os índices de diversidade de Chao apresentaram os seguintes resultados: microbiota intestinal dos ácaros 15,000 (4,242641), casca do queijo 12,500 (7,778175) e meio do queijo 10,500 (2,12132) (**Figura 3A**). Os índices de diversidade de Shannon, que representa a diversidade global de cada amostra, apresentaram os seguintes resultados: microbiota intestinal dos ácaros 1,89287145 (0,3848664), casca do queijo 1,74057555 (0,3519828) e meio do queijo 1,96175820 (0,1097182) (**Figura 3B**). Os índices de diversidade de Simpson, que leva em consideração tanto o padrão de abundância quanto a riqueza de espécies, representando a dominância de táxons, apresentaram os seguintes resultados: microbiota intestinal dos ácaros 0,7662159 (0,133513), casca do queijo 0,7941986 (0,057922) e meio do queijo 0,8336739 (0,014859) (**Figura 3C**). Os três índices de diversidade avaliados das diferentes amostras foram comparados estatisticamente e não houve diferença significativa entre as amostras (Tukey,  $p > 0,05$ ).

**Figura 3** - Análise dos índices de diversidade dos grupos experimentais. A: índice de Chao; B: índice de Shanon; C: índice de Simpson. Os valores de cada amostra dentro de cada índice foram comparados pelo teste-T.

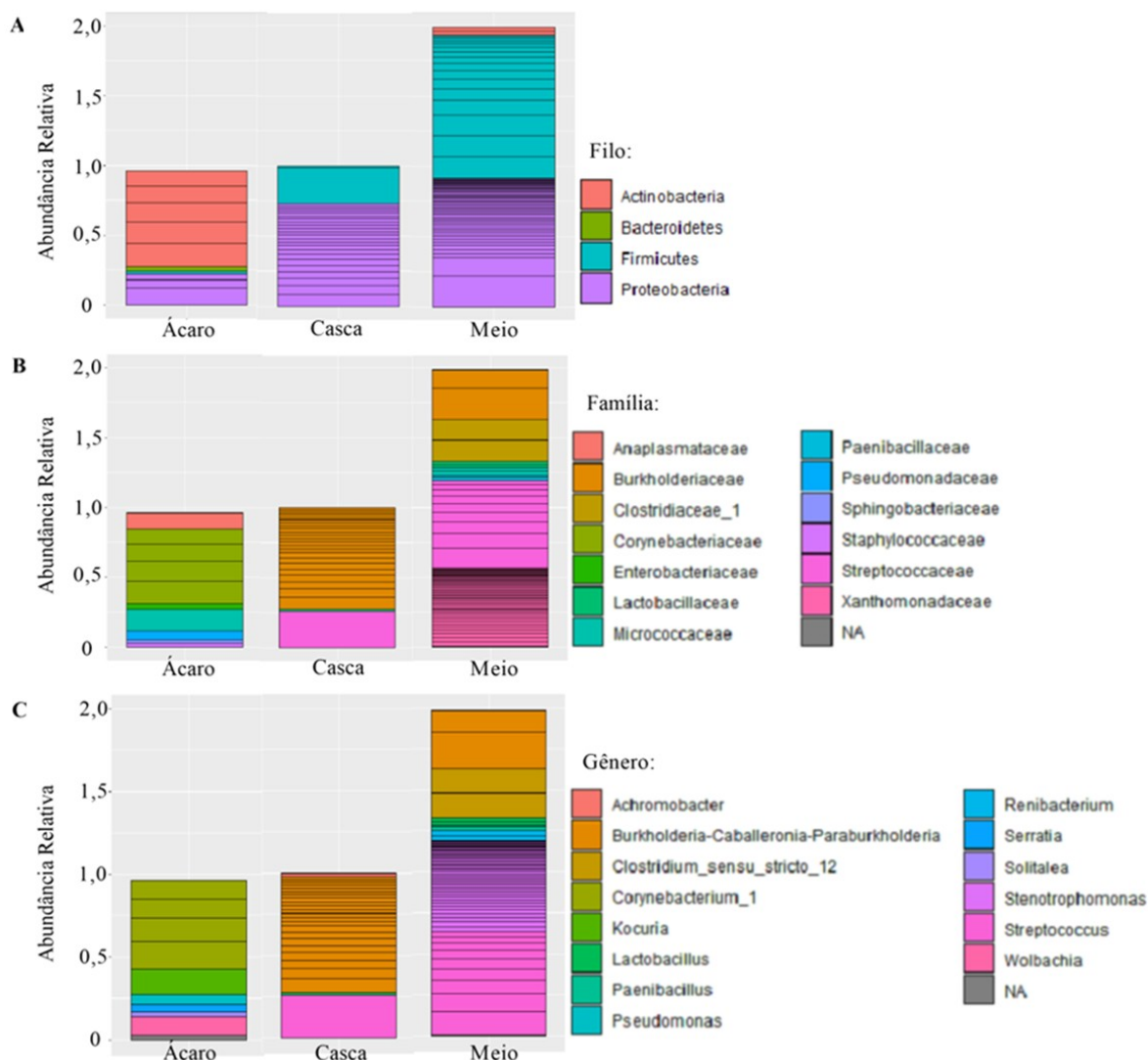


A distribuição dos táxons mais abundantes classificados em nível taxonômico de Filo, Família e Gênero são apresentados na **Figura 4**. Nas amostras analisadas os filos mais abundantes foram: Actinobacteria, Bacteriodetes, Firmicutes e Proteobacteria (**Figura 4A**); 13 famílias foram observadas: Anaplasmataceae, Burkholderiaceae, Clostridiaceae\_1, Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae, Paenibacillaceae, Pseudomonadaceae, Sphingobacteriaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae e Xanthomonadaceae (**Figura 4B**); 14 gêneros: *Achromobacter*, *Burkholderia*-*Caballeronia*-

*Paraburkholderia*, *Clostridium\_sensu\_stricto\_12*, *Corynebacterium\_1*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Renibacterium*, *Serratia*, *Solitalea*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus* e *Wolbachia* (**Figura 4C**).

Em nível de filo (**Figura 4A**), a microbiota dos ácaros foi predominantemente composta por Actinobactérias, seguida por Proteobactérias, Bacteroides e Firmicutes. A casca do queijo foi composta por Proteobactéria (predominante) e Firmicutes. Já o meio do queijo possuiu predominância de Firmicutes, seguidos por Proteobactéria e Actinobactéria. A predominância em nível de família (**Figura 4B**) da microbiota dos ácaros foi composta de Corynebacteriaceae, da casca do queijo por Burkolderiaceae e o meio do queijo por Streptococcaceae. Já em nível de gênero (**Figura 4C**), a predominância da microbiota dos ácaros foi composta por *Corynebacterium\_1*, da casca do queijo por *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* e o meio do queijo por *Streptococcus*.

**Figura 4** - Distribuição taxonômica das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) em nível de Filo (A), Família (B) e Gênero (C) das bactérias e arqueobactérias identificados nos grupos experimentais.



O número de taxons em nível de gênero identificados em cada amostra estão dispostos na **Figura 5**, com duas UTOs compartilhadas entre a microbiota bacteriana intestinal dos ácaros e da casca do queijo (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* e *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*) e duas UTOs compartilhadas entre a microbiota bacteriana intestinal dos ácaros e o meio do queijo (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* e *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*). Nenhuma UTO identificada em nível de gênero é compartilhada

simultaneamente entre a microbiota bacteriana intestinal dos ácaros, da casca do queijo e do meio do queijo.

**Figura 5** - Diagrama de Venn apresentando todos os táxons em nível de gênero compartilhados e específicos entre as amostras analisadas (intestino do ácaro, casca do queijo e meio do queijo).



Apesar das espécies compartilhadas entre microbiota dos ácaros e casca ou meio do queijo apresentarem a mesma denominação em nível de gênero (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*), foi possível identificar que estas apresentam sequências do gene 16S rRNA que diferem entre si ao nível de 99% de similaridade, sendo portanto espécies ou isolados diferentes. Os gêneros exclusivos presentes nas amostras de ácaros em abundância estão dispostas na **Tabela 1**. Os gêneros exclusivos presentes nas amostras da casca do queijo estão dispostas na **Tabela 2**. Os gêneros exclusivos presentes nas amostras do meio do queijo estão dispostas na **Tabela 3**.

**Tabela 1** - Táxons bacterianos identificados à nível de gênero exclusivos das amostras do intestinos dos ácaros.

| Filo           | Classe              | Ordem                 | Família             | Gênero   |
|----------------|---------------------|-----------------------|---------------------|--|
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Streptococcaceae    | Streptococcus                                      |
| Firmicutes     | Bacilli             | Bacillales            | Staphylococcaceae   | Staphylococcus                                     |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Betaproteobacteriales | Burkholderiaceae    | Burkholderia-<br>Caballeronia-<br>Paraburkholderia |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Betaproteobacteriales | Burkholderiaceae    | Burkholderia-<br>Caballeronia-<br>Paraburkholderia |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Betaproteobacteriales | Burkholderiaceae    | Burkholderia-<br>Caballeronia-<br>Paraburkholderia |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Betaproteobacteriales | Burkholderiaceae    | Achromobacter                                      |
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Corynebacteriales     | Corynebacteriaceae  | Corynebacterium_1                                  |
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Corynebacteriales     | Corynebacteriaceae  | Corynebacterium_1                                  |
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Micrococcales         | Micrococcaceae      | Kocuria  |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Lactobacillaceae    | Lactobacillus                                      |
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Corynebacteriales     | Corynebacteriaceae  | Corynebacterium_1                                  |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Streptococcaceae    | Streptococcus                                      |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadales       | Pseudomonadaceae    | Pseudomonas  |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhizobiales           | Rhizobiaceae        | NA   |
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Corynebacteriales     | Corynebacteriaceae  | Corynebacterium_1                                  |
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Micrococcales         | Brevibacteriaceae   | Brevibacterium                                     |
| NA             | NA                  | NA                    | NA                  | NA   |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriales     | Enterobacteriaceae  | Serratia   |
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Micrococcales         | NA                  | NA   |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhizobiales           | Rhizobiaceae        | Mesorhizobium                                      |
| Bacteroidetes  | Bacteroidia         | Sphingobacteriales    | Sphingobacteriaceae | Solitalea  |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Lactobacillaceae    | Lactobacillus                                      |
| Bacteroidetes  | Bacteroidia         | Sphingobacteriales    | Sphingobacteriaceae | Solitalea  |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Streptococcaceae    | Lactococcus  |
| Firmicutes     | Bacilli             | Bacillales            | Bacillaceae         | Bacillus   |

**Tabela 2** - Táxons bacterianos identificados à nível de gênero exclusivos das amostras do meio do queijo.

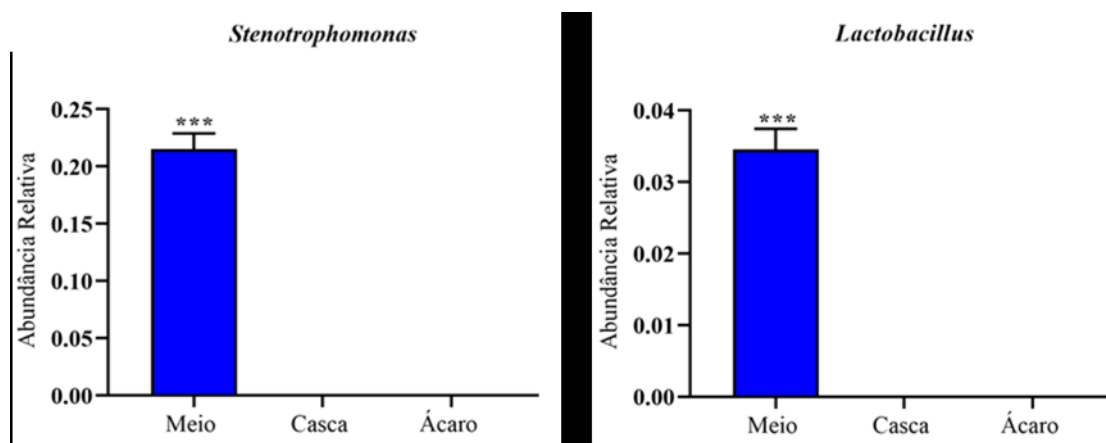
| Filo           | Classe              | Ordem                 | Família          | Gênero                       |
|----------------|---------------------|-----------------------|------------------|------------------------------|
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Xanthomonadales       | Xanthomonadaceae | Stenotrophomonas             |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Lactobacillaceae | Lactobacillus                |
| Firmicutes     | Clostridia          | Clostridiales         | Clostridiaceae_1 | Clostridium_sensu_stricto_12 |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Xanthomonadales       | Xanthomonadaceae | Stenotrophomonas             |
| Firmicutes     | Clostridia          | Clostridiales         | Clostridiaceae_1 | Clostridium_sensu_stricto_12 |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Lactobacillaceae | Lactobacillus                |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Xanthomonadales       | Xanthomonadaceae | Stenotrophomonas             |
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Micrococcales         | Micrococcaceae   | Renibacterium                |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Streptococcaceae | NA                           |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Lactobacillaceae | Lactobacillus                |
| Firmicutes     | Bacilli             | Bacillales            | Paenibacillaceae | Paenibacillus                |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Lactobacillaceae | Lactobacillus                |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Streptococcaceae | Anthococcus                  |
| Firmicutes     | Bacilli             | Bacillales            | Paenibacillaceae | Paenibacillus                |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | NA                    | NA               | NA                           |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Streptococcaceae | NA                           |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Betaproteobacteriales | Burkholderiaceae | Achromobacter                |

**Tabela 3** - Táxons bacterianos identificados à nível de gênero exclusivos das amostras da casca do queijo.

| Filo           | Classe              | Ordem                 | Família            | Gênero   |
|----------------|---------------------|-----------------------|--------------------|--|
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rickettsiales         | Anaplasmataceae    | Wolbachia  |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rickettsiales         | Anaplasmataceae    | Wolbachia  |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rickettsiales         | Anaplasmataceae    | Wolbachia  |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rickettsiales         | Anaplasmataceae    | Wolbachia  |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Betaproteobacteriales | Burkholderiaceae   | Burkholderia-<br>Caballeronia-<br>Paraburkholderia |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Streptococcaceae   | Streptococcus                                      |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rickettsiales         | Anaplasmataceae    | Wolbachia  |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rickettsiales         | Anaplasmataceae    | Wolbachia  |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rickettsiales         | Anaplasmataceae    | Wolbachia  |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Acetobacterales       | Acetobacteraceae   | Gluconobacter                                      |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Betaproteobacteriales | Burkholderiaceae   | Achromobacter                                      |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Lactobacillaceae   | Lactobacillus                                      |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhizobiales           | Rhizobiaceae       | Mesorhizobium                                      |
| Firmicutes     | Bacilli             | Bacillales            | Bacillaceae        | Geobacillus  |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriales     | Enterobacteriaceae | NA   |
| Bacteroidetes  | Bacteroidia         | Cytophagales          | NA                 | NA   |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Sphingomonadales      | Sphingomonadaceae  | Sphingomonas                                       |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Betaproteobacteriales | Burkholderiaceae   | Comamonas  |
| Bacteroidetes  | Bacteroidia         | Cytophagales          | Cytophagaceae      | Cytophaga  |
| Firmicutes     | Bacilli             | Lactobacillales       | Streptococcaceae   | Streptococcus                                      |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Sphingomonadales      | Sphingomonadaceae  | Novosphingobium                                    |
| Actinobacteria | Rubrobacteria       | Rubrobacteriales      | Rubrobacteriaceae  | Rubrobacter  |

De todas as UTOs classificadas em nível de gênero, os táxons *Stenotrophomonas* e *Lactobacillus* apresentam abundância significativa estando presentes no meio do queijo (**Figura 6**). As demais espécies, mesmo as compartilhadas entre a microbiota bacteriana intestinal dos ácaros com a casca ou meio do queijo, não apresentaram abundância diferindo significativamente.

**Figura 6** - Gêneros com abundância diferindo significativamente entre as amostras analisadas (Tukey,  $p < 0,05$ ).





## 5.4 DISCUSSÃO

A presença do ácaro cosmopolita *T. putrescentiae* demonstra sua predominância em queijos maturados brasileiros e a importância e interesse deste trabalho para outros países (CARVALHO *et al.*, 2018a; 2018b, 2020).

Pela classificação em nível de gênero, os táxons *Stenotrophomonas* e *Lactobacillus*, presentes no meio do queijo, foram os únicos que apresentaram abundância significativa, sendo o primeiro gênero encontrado somente nessas amostras. O gênero *Stenotrophomonas* compreende um grupo de pelo menos oito espécies, encontradas em diferentes ambientes, particularmente associadas a plantas (Ryan *et al.*, 2009), mas interessante há registro de duas espécies desse gênero encontradas em máquinas de ordenha na Alemanha (WEBER *et al.*, 2018), demonstrando sua associação com o leite.

As bactérias do gênero *Stenotrophomonas* não estavam presentes na microbiota bacteriana intestinal dos ácaros, já as bactérias do gênero *Lactobacillus* foram identificadas também na microbiota dos ácaros (**Tabela 1**) e na casca do queijo (**Tabela 3**) embora que, de forma não significativa, em termos de abundância. Um estudo realizado por Erban *et al.* (2016) em *T. putrescentiae* demonstrou que a dieta e os habitats em que os ácaros se encontram influenciam não apenas nas bactérias por eles ingeridas, mas também as bactérias simbióticas da microbiota destes.

Bactérias do gênero *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, consideradas do grupo das bactérias do ácido láctico (CHIBUZOR-ONYEMA *et al.*, 2021), já tiveram presença identificada em outros alimentos fermentados, como vinho de arroz (LIU *et al.*, 2022), e a presença neste alimento foi relacionada à diminuição de formação de ácido láctico, cítrico e succínico e presença de aminoácidos livres. No entanto, apresentou correlação positiva com a presença de pentanoato de etila sugerindo que este gênero microbiano pode levar ao aumento de compostos voláteis de sabor durante a fermentação (LIU *et al.*, 2022), porém cada alimento possui uma composição diferente podendo resultar em compostos distintos.

Em dois tipos de queijos brasileiros (Colonial e Minas Artesanal) maturados na presença de ácaros *T. putrescentiae*, Carvalho *et al.* (2020) identificaram, em

comum, um aumento nas concentrações dos compostos voláteis butanoato de isoamil e 2-nonanol em comparação aos mesmos queijos maturados sem ácaros. Identificaram também, a diminuição de ácido láctico, como relatado por Liu *et al.* (2022), a diminuição de ácidos graxos e o aumento de glicerol, alanina e ácido cítrico.

Chibuzor-Onyema *et al.* (2021) indicaram que *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, assim como outras bactérias fermentadoras do ácido láctico (*Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*) podem contribuir com a redução de micotoxinas em alimentos. Espécies do gênero *Lactobacillus* também estavam presentes nas amostras da casca do queijo (**Tabela 3**) e da microbiota dos ácaros (**Tabela 1**) e *Lactococcus* estavam presente na casca do queijo (**Tabela 3**).

## 5.5 CONCLUSÃO

*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* foi o único gênero de bactérias compartilhado entre as amostras intestinais dos ácaros e casca do queijo ou amostras intestinais dos ácaros e meio do queijo. Por se tratar de uma bactéria ácido láctica, é possível que contribua com a melhoria dos quesitos sensoriais do queijo.

Não foram identifiados potenciais patógenos na microbiota do sistema digestório do ácaro interagindo com a microbiota do queijo, podendo se concluir que, neste quesito, é seguro o consumo de queijos maturados na presença de ácaros.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados demonstram que a maturação de queijos na presença de ácaros (Acari: Acaridae) presente em território nacional ocasiona uma diferenciação no produto final pela produção de metabólitos e COVs. As avaliações quimiométricas demonstraram influências semelhantes em dois tipos de queijos brasileiros maturados na presença de ácaros (queijo Minas e Colonial) com a identificação de aroma frutado em suas superfícies. Os ácaros também podem contribuir para a formação da reação de *Maillard* conferindo aos queijos uma cor marrom escura e um sabor adocicado de caramelo. A presença dos ácaros influenciou na diminuição dos ácidos láctico e graxos e no aumento do glicerol, alanina e ácido cítrico na superfície de ambos os queijos. Com estes resultados é possível afirmar que os ácaros da espécie *T. putrescentiae*, presentes nos queijos brasileiros, exercem uma função tecnológica, assim como as espécies de ácaros presentes nos queijos europeus (*Mimolette* e *Milbenkäse*).

Pela avaliação de consumo *in vivo* por camundongos tratados (imunossuprimidos) e não tratados com CY, a presença de ácaros durante a maturação dos queijos não influenciou negativamente na saúde dos indivíduos que se alimentaram deste produto em comparação aos indivíduos que se alimentaram de queijos maturados na ausência de ácaros e em comparação ao grupo controle. Nos grupos de camundongos tratados com CY a imunossupressão foi revertida após o consumo exclusivo de queijos maturados na presença ou ausência de ácaros. O estudo demonstrou que o consumo de queijos maturados na presença de ácaros *T. putrescentiae* é potencialmente seguro.

Quanto a avaliação da interação da microbiota dos ácaros e da microbiota dos queijos constatou-se que *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* foi o único gênero de bactérias compartilhado entre as amostras intestinais dos ácaros e casca do queijo ou amostras intestinais dos ácaros e meio do queijo. O gênero *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* pode estar contribuindo satisfatoriamente no quesito sensorial do queijo e, pela análise não ter identificado nenhuma bactéria potencialmente patogênica interagindo entre os ácaros e o queijo,

pode-se aferir segurança para a maturação de queijos na presença de ácaros *T. putrescentiae* do ponto de vista microbiológico.

Esta tese corrobora para um melhor entendimento e avanço do estado da arte no âmbito da maturação de queijos na presença de ácaros. Os resultados aqui obtidos inferem sobre o real efeito destes ácaros como coadjuvantes tecnológicos e sobre a segurança de consumo deste tipo de produto. A prática de utilização intencional de ácaros durante a maturação de queijos era desconhecida do ponto de vista científico de segurança de consumo até então e dados pioneiros foram obtidos neste trabalho em âmbito nacional e internacional.

## 7 REFERÊNCIAS

ABBAR, S.; JEFF, M. W. S. R.; THOMAS, W. Efficacy of selected pesticides against *Tyrophagus putrescentiae* ( Schrank ): influences of applied concentration , application substrate , and residual activity over time. **Journal of Pest Science**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 379–387, 2017.

ABOU EL-ATTA, D. A. E. M.; GHAZY, N. A.; OSMAN, M. A. Effects of temperature on the life-history traits of *Sancassania (Caloglyphus) berlesei* (Acari: Astigmatina: Acaridae) feeding on root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae). **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 299–307, 2014.

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. **Journal Am Soc Mass Spectrom**, [s. l.], v. 8, p. 671–672, 1997.

ALVES FILHO, E. de G.; RODRIGUES, T. H. S.; FERNANDES, F. A. N.; PEREIRA, A. L. F.; NARAIN, N.; DE BRITO, E. S.; RODRIGUES, S. Chemometric evaluation of the volatile profile of probiotic melon and probiotic cashew juice. **Food Research International**, [s. l.], v. 99, p. 461–468, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.030>.

ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; DE BRITO, E. S.; WURLITZER, N. J.; FERNANDES, F. A. N.; RABELO, M. C.; FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S. Evaluation of thermal and non-thermal processing effect on non-prebiotic and prebiotic acerola juices using  $^1\text{H}$  qNMR and GC–MS coupled to chemometrics. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 265, p. 23–31, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.038>.

ANSCHAU, A.; ARAGÃO, V. C.; PORCIUNCULA, B. D. A.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 22, n. 11, p. 2148–2156, 2011.

AUBERT, C.; GÜNATA, Z.; AMBID, C.; BAUMES, R. Changes in physicochemical characteristics and volatile constituents of yellow- and white-fleshed nectarines during maturation and artificial ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 10, p. 3083–3091, 2003.

AYGUN, O.; YAMAN, M.; DURMAZ, H. A survey on occurrence of *tyrophagus putrescentiae* (acari: acaridae) in surk, a traditional turkish dairy product. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 878–881, 2007.

BARZEGAR, H.; ALIZADEH BEHBAHANI, B.; FALAH, F. Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk cheeses. **Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 4094–4107, 2021.

BELLESIA, F.; PINETTI, A.; PAGNONI, U. M.; RINALDI, R.; ZUCCHI, C.; CAGLIOTI,

L.; PALYI, G. Volatile components of Grana Parmigiano-Reggiano type hard cheese. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 83, p. 55–61, 2003.

BERTUZZI, A. S.; MCSWEENEY, P. L. H.; REA, M. C.; KILCAWLEY, K. N. Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 371–390, 2018.

BOCH, R.; SHEARER, D. A.; STONE, B. C. Identification of iso-amylacetate as an active component in the sting pheromone of the honey bee. **Nature**, [s. l.], v. 1, n. 195, p. 1018, 1962.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BRÄNDLE, J.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. **Food Control**, [s. l.], v. 67, p. 96–113, 2016.

BRASIL. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, [s. l.]

BRASIL. Resolução nº 14, de 28 de março de 2014 - Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**, [s. l.], p. 58, 2014.

BRITO, H. S.; ALENCAR, F. C.; ALBUQUERQUE, B.; SILVA, M. G.; FELIX, M. K.; MULHOLLAND, D. S.; OLIVEIRA, E. E.; MARIÚBA, L. A. M.; SOBRINHO, E. M.; BRANDI, I. V.; LOBATO, F. C. F.; CANGUSSU, A. S. R. Pathologic findings on ruminant enteric clostridial diseases reveal specificities and differences among iota and iota-like toxins. **Revista de Ciências Agrícolas**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 157–174, 2021.

BRUCKNER, A.; HEETHOFF, M. Scent of a mite: origin and chemical characterization of the lemon-like flavor of mite-ripened cheeses. **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 69, p. 249–261, 2016.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CANGUSSU, A. S. R.; MARIÚBA, L. A. M.; LALWANI, P.; PEREIRA, K. D. E. S.; ASTOLPHI-FILHO, S.; ORLANDI, P. P.; EPIPHANIO, S.; VIANA, K. F.; RIBEIRO, M. F. B.; SILVA, H. M.; MARINHO, C. R. F.; NOGUEIRA, P. A. A hybrid protein containing MSP1a repeats and Omp7, Omp8 and Omp9 epitopes protect immunized BALB/c mice against anaplasmosis. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 1–11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0503-4>.

CARVALHO, M. M. Identificação e avaliação da aptidão tecnológica de espécies de ácaros presentes em queijos maturados brasileiros. **Dissertação de mestrado pós graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina**,

[s. l.], p. 115, 2018.

CARVALHO, M. M.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; MARTINS, F. I. C. C.; MATIOLI, A. L.; OLIVEIRA, E. E.; RODRIGUES, T. H. S.; FORTES FERREIRA, C. L. L.; MACHADO DA SILVA, N.; ZOCOLO, G. J.; DE DEA LINDNER, J. Chemometric evaluation of the metabolites and volatile profiles of mite-ripened cheeses. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 110, 2020.

CARVALHO, M. M.; DE FARIÑA, L. O.; STRONGIN, D.; FERREIRA, C. L. L. F.; LINDNER, J. D. D. Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], 2019.

CARVALHO, M. M.; MACHADO DA SILVA, N.; MATIOLI, A. L.; OLIVEIRA, E. E.; FERREIRA, C. L. L.; DE DEA LINDNER, J. Morphological and molecular characteristics of stored-product mites found on Brazilian ripened cheeses. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 79, p. 79–82, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022474X18303515>.

CARVALHO, M. M.; OLIVEIRA, E. E.; MATIOLI, A. L.; FERREIRA, C. L. L.; MACHADO DA SILVA, N.; DE DEA LINDNER, J. Stored products mites in cheese ripening: Health aspects, technological and regulatory challenges in Brazil. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 76, p. 116–121, 2018.

CHEN, W. Host Innate Immune Responses to *Acinetobacter baumannii* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. September, p. 1–16, 2020.

CHIBUZOR-ONYEMA, I. E.; EZEOKOLI, O. T.; SULTYOK, M.; NOTUNUNU, I.; PETCHKONGKAEW, A.; ELLIOTT, C. T.; ADELEKE, R. A.; KRASKA, R.; EZEKIEL, C. N. Metataxonomic analysis of bacterial communities and mycotoxin reduction during processing of three millet varieties into ogi, a fermented cereal beverage. **Food Research International**, [s. l.], v. 143, n. November 2020, p. 110241, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110241>.

CHRISTOFF, A. P.; FERNANDA, A.; SEREIA, R.; DELLYANA, ; BOBERG, R.; LUCIO, R.; DE MORAES, V.; FELIPE VALTER DE OLIVEIRA, L. Sequencing Neopropecta Microbiome Technologies Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **White Paper: Bacterial NGS**, [s. l.], n. May 2017, 2017. Disponível em: <http://neopropecta.com>.

CODEX ALIMENTARIUS. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. [s. l.], v. Twenty-fif, p. 45–52, 2003.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R. Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Talanta**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 200–205, 2008.

DA SILVA OLIVEIRA, M. S.; SILVA-AMPARO, L. Food-based dietary guidelines: A comparative analysis between the Dietary Guidelines for the Brazilian Population

2006 and 2014. **Public Health Nutrition**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 210–217, 2018.

DAWOOD, S.; ALI, F. Identification and Natural Control of Mite in Ras Cheese. **Journal of Food Processing & Technology**, [s. l.], v. 06, n. 04, p. 435, 2015. Disponível em: <http://www.omicsonline.org/open-access/identification-and-natural-control-of-mite-in-ras-cheese-2157-7110-1000435.php?aid=51172>.

DE ANGELIS CURTIS, S.; CURINI, R.; DELFINI, M.; BROSIO, E.; D'ASCENZO, F.; BOCCA, B. Amino acid profile in the ripening of Grana Padano cheese: A NMR study. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 495–502, 2000.

DEONG, E. R.; ROADHOUSE, C. L. Cheese Pests and Their Control. **University of California Publications**, [s. l.], n. Bulletin 343, 1922.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 180–185, 2013.

DOUWLING, G. B.; THOMAS, E. W. Cheese Itch: Contact Dermatitis due to Mite-infested Cheese Dust. **British Medical Journal**, [s. l.], p. 543, 1942.

EALLES, B. The life history and economy of the cheese mites. **Annals of Applied Biology**, [s. l.], v. 4, n. 1–2, p. 28–35, 1917.

ERBAN, T.; KLIMOV, P. B.; SMRZ, J.; PHILLIPS, T. W.; NESVORNA, M.; KOPECKY, J.; HUBERT, J. Populations of stored product mite tyrophagus putrescentiae differ in their bacterial communities. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. JUL, p. 1–19, 2016.

EUROPE. Regulamento nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, [s. l.], v. 31, p. 1–24, 2002.

FACCIA, M.; NATRELLA, G.; GAMBACORTA, G. Cheese ripening in nonconventional conditions: A multiparameter study applied to Protected Geographical Indication Canestrato di Moliterno cheese. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 140–153, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2021-20845>.

FAN, W.; QIAN, M. C. Characterization of aroma compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jiannanchun” liquors by aroma extract dilution analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 2695–2704, 2006.

FDA. Domestic and Imported Cheese and Cheese Products. **Food and Drug Administration Compliance Program Guidance Manual**, [s. l.], v. Chapter 03, p. 1–36, 2017.

FELIX, M. K. C.; DEUSDARÁ, T. T.; SANTOS, L. S. S.; AGUIAR, R. W. S.; CORRÊA, R. F. T.; BRANDI, I. V.; SOBRINHO, E. M.; RIBEIRO, B. M.; MARIÚBA, L. A. M.; NOGUEIRA, P. A.; COSTA, K. S.; VIANA, K. F.; CANGUSSU, A. S. R.



Inactivated alpha toxin from *Clostridium novyi* type B in nano-emulsion protect partially protects Swiss mice from lethal alpha toxin challenge. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

FERRARI, G.; LABLANQUIE, O.; CANTAGREL, R.; LEDAUPHIN, J.; PAYOT, T.; FOURNIER, N.; GUICHARD, E. Determination of Key Odorant Compounds in Freshly Distilled Cognac Using GC-O, GC-MS, and Sensory Evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 18, p. 5670–5676, 2004. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf049512d>.

FLECHTMANN, C. W. H. **Acaros em produtos armazenados e em poeira domiciliar**. [S. l.: s. n.], 1986. 1986.

FRANCE. Décret n°2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères. **Journal Officiel de la République Française**, [s. l.], 2017.

GOLOVNYA, R. V.; MIRONOV, G. A.; SOKOLOV, S. D. The Chemistry of the Odour of Foodstuffs. **Russian Chemical Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 366–385, 2016.

GRASSO, C.; ERAMO, V.; LEMBO, M.; FORNITI, R.; CARBONI, C.; BOTONDI, R. Effects of gaseous ozone treatment on the mite pest control and qualitative properties during ripening storage of pecorino cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], n. 103, p. 2124–2133, 2022.

GURKAN, H.; YILMAZTEKIN, M.; CAKMAKCI, S.; HAYALOGLU, A. A. Volatile compounds and biogenic amines during the ripening of mold-ripened Civil cheese manufactured using three different strains of *Penicillium roqueforti*. **Journal of Food Safety**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 1–14, 2018.

HAKEN, J. K.; MADDEN, B. G. J. K. HAKEN\* and B. G. MADDEN. **Journal of Chromatography**, [s. l.], v. 325, p. 61–73, 1985.

HASAN, M.; AIKINS, M. J.; SCHILLING, W.; PHILLIPS, T. W. Efficacy of Controlled Atmosphere Treatments to Manage Arthropod Pests of Dry-Cured Hams. **Insects**, [s. l.], v. 44, p. 1–15, 2016.

HERRMANN, S. Die Regionale Spezialität “Altenburger Milbenkäse”: Eine Analyse des Produktes, der Herstellung und des Marktes. Diplom Arbeit), Jena, Germany: University of Jena. 2005. **Diplom Arbeit. Germany: University of Jena**, [s. l.], p. 151, 2005.

HUBERT, J.; JAROŠÍK, V.; MOUREK, J.; KUBÁTOVÁ, A.; ŽDÁRKOVÁ, E. Astigmatid mite growth and fungi preference (Acari: Acaridida): Comparisons in laboratory experiments. **Pedobiologia**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 205–214, 2004.

HUBERT, J.; KOPECKÝ, J.; PEROTTI, M. A.; NESVORNÁ, M.; BRAIG, H. R.; SÁGOVÁ-MAREČKOVÁ, M.; MACOVEI, L.; ZUREK, L. Detection and Identification of Species-Specific Bacteria Associated with Synanthropic Mites. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 919–928, 2012.

ISIGNY SAINTE-MÈRE. <https://www.isigny-ste-mere.com/en/our-cheeses/our-mimolette/> acessado em 02/02/23 às 18h19min.

IWANIAK, A.; MOGUT, D. Metabolic syndrome-preventive peptides derived from milk proteins and their presence in cheeses: A review. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], v. 10, n. 8, 2020.

JIN, J. S.; KWON, S. O.; MOON, D. C.; GURUNG, M.; LEE, J. H.; KIM, S. II; LEE, J. C. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein a via outer membrane vesicles. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 2, 2011.

JOH, S. J. E.; Y. AHN; C. HUH; MYUNG J. HAN; D. KIM. *Lactobacillus casei* HY7213 ameliorates cyclophosphamide-induced immuno suppression in mice by activating NK, cytotoxic t cells and macrophages. **Imunofarmacologia e Imunotoxicologia**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 396–402, 2013.

KAMINARIDES, S.; STAMOU, P.; MASSOURAS, T. Changes of organic acids , volatile aroma compounds and sensory characteristics of Halloumi cheese kept in brine. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 100, p. 219–225, 2007.

KARAHADIAN, C.; JOSEPHSON, D. B.; LINDSAY, R. C. Contribution of *Penicillium* sp. to the Flavors of Brie and Camembert Cheese. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 68, p. 1865–1877, 1985.

KAZUMASA FUKUDA, MIDORI OGAWA, H. T. and M. S. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities : Targeting the. **J. Uoeh**, [s. l.], p. 223–232, 2016.

KEENEY, P. G.; PATTON, S. The Coconut-Like Flavor Defect of Milk Fat. I. Isolation of the Flavor Compound from Butter Oil and its Identification as  $\delta$ -Decalactone. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 1104–1113, 1956.

KIM, Y. A.; LEE, S. S.; YOO, J.; KIM, E. M.; NAM, M. S.; KIM, K. K. Effects of Gouda cheese and *Allium hookeri* on thermogenesis in mice. **Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 1232–1239, 2021.

KURAMITSU, K.; ISHIHARA, T.; SUGITA, A.; YOBOON, T. The attraction of *Tremex apicalis* ( Hymenoptera , Siricidae , Tremecinae ) and its parasitoid *Ibalia japonica* ( Hymenoptera , Ibaliiidae ) to the fungus *Cerrena unicolor*. **Journal of Hymenoptera**, [s. l.], v. 48, p. 37–48, 2019.

LEDAUPHIN, J.; SAINT-CLAIR, J. F.; LABLANQUIE, O.; GUICHARD, H.; FOUNIER, N.; GUICHARD, E.; BARILLIER, D. Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and cognac using preparative separations coupled with gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 16, p. 5124–5134, 2004.

LEKSHMI SHEELA, D.; NAZEEM, P. A.; NARAYANANKUTTY, A.; MANALIL, J. J.; RAGHAVAMENON, A. C. In Silico and Wet Lab Studies Reveal the Cholesterol Lowering Efficacy of Lauric Acid, a Medium Chain Fat of Coconut Oil. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 410–415, 2016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1007/s11130-016-0577-y>.

LIU, A.; YANG, X.; GUO, Q.; LI, B.; ZHENG, Y.; SHI, Y.; ZHU, L. Microbial Communities and Flavor Compounds during the Fermentation of Traditional Hong Qu Glutinous Rice Wine. **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 8, 2022.

LUIGI MOIO; PAOLA PIOMBINO; FRANCESCO ADDEO. Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 67, n. 02, p. 273–285, 2000. Disponível em: [http://journals.cambridge.org/abstract\\_S0022029900004106](http://journals.cambridge.org/abstract_S0022029900004106).

MADAN, N.; QUINTILIANI, S.; PATEL, P.; PATEL, V. The tale of the traveling cheese: Shigella in a lung transplant patient. **Respiratory Medicine Case Reports**, [s. l.], v. 37, n. 101645, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2022.101645>.

MAHAJAN, S. S.; GODDIK, L.; QIAN, M. C. Aroma Compounds in Sweet Whey Powder. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 87, n. 12, p. 4057–4063, 2004. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203020473547X>.

MARCELLINO, S. N.; BENSON, D. R. The Good , the Bad , and the Ugly : Tales of Mold-Ripened Cheese. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–27, 2013.

MARTINS, J. M.; GALINARI, É.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese , a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 46, p. 219–230, 2015.

MAZZEI, P.; PICCOLO, A. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 132, n. 3, p. 1620–1627, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.142>.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2013.

MEHINAGIC, E.; ROYER, G.; SYMONEAUX, R.; JOURJON, F.; PROST, C. Characterization of odor-active volatiles in apples: Influence of cultivars and maturity stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 2678–2687, 2006.

MELNYK, J. P.; SMITH, A.; SCOTT-DUPREE, C.; MARCONE, M. F.; HILL, A. Identification of cheese mite species inoculated on Mimolette and Milbenkase cheese through cryogenic scanning electron microscopy. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 93, n. 8, p. 3461–3468, 2010. Disponível em: <http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022030210003644/fulltext>.

MENA-SÁNCHEZ, G.; BABIO, N.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.; CORELLA, D.; SCHRÖDER, H.; VIOQUE, J.; ROMAGUERA, D.; MARTÍNEZ, J. A.; LOPEZ-MIRANDA, J.; ESTRUCH, R.; WÄRNBERG, J.; BUENO-CAVANILLAS, A.; SERRA-MAJEM, L.; TUR, J. A.; ARÓS, F.; TINAHONES, F. J.; SÁNCHEZ, V. M.; LAPETRA,

J.; PINTÓ, X.; VIDAL, J.; VÁZQUEZ, C.; ORDOVÁS, J. M.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; MATÍA-MARTÍN, P.; BASORA, J.; BUIL-COSIALES, P.; FERNANDEZ-CARRION, R.; FITÓ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. Fermented dairy products, diet quality, and cardio-metabolic profile of a Mediterranean cohort at high cardiovascular risk. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 1002–1011, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.05.006>.

MÉNAGER, I.; JOSTE, M.; AUBERT, Ch. Changes in Physicochemical Characteristics and Volatile Constituents of Strawberry ( Cv . Cigaline ) during Maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, p. 1248–1254, 2004.

MENG, Y.; LI, B.; JIN, D.; ZHAN, M.; LU, J.; HUO, G. Immunomodulatory activity of lactobacillus plantarum KLDS1.0318 in cyclophosphamide-treated mice. **Food and Nutrition Research**, [s. l.], v. 62, p. 1–9, 2018.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 142–151, 2011. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70218-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70218-8).

NAGARAJAN, S.; RAO, L. J. M.; GURUDUTT, K. N. Chemical composition of the volatiles of *Decalepis hamiltonii* (Wight & Arn). **Flavour and Fragrance Journal**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 27–29, 2001.

PADILHA, G. S.; TAMBOURGI, E. B.; ALEGRE, R. M. Evaluation of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in alginate beads and application in the synthesis of banana flavor (isoamyl acetate). **Chemical Engineering Communications**, [s. l.], v. 205, n. 1, p. 23–33, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1370707>.

PENNARUN, A. L.; PROST, C.; DEMAIMAY, M. Identification and origin of the character-impact compounds of raw oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 82, n. 14, p. 1652–1660, 2002.

POZO-BAYÓN, M. A.; RUÍZ-RODRÍGUEZ, A.; PERNIN, K.; CAYOT, N. Influence of eggs on the aroma composition of a sponge cake and on the aroma release in model studies on flavored sponge cakes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 1418–1426, 2007.

PULIDO, M. R.; GARCÍA-QUINTANILLA, M.; PACHÓN, J.; MCCONNELL, M. J. A lipopolysaccharide-free outer membrane vesicle vaccine protects against *Acinetobacter baumannii* infection. **Vaccine**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 719–724, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.11.043>.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

RAVUSSIN, Y.; EDWIN, E.; GALLOP, M.; XU, L.; BARTOLOMÉ, A.; KRAAKMAN, M. J.; LEDUC, C. A.; JR, A. W. F. Evidence for a non-leptin system that defends against weight gain in overfeeding. **Cell Metab**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 289–299, 2018.

REZENDE, C. M.; FRAGA, S. R. G. Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 425–428, 2003.

ROBERTSON, P. L. Cheese Mite Infestation - An Important Storage Problem. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 86–95, 1952. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0307.1952.tb01555.x>.

ROBERTSON, P. L. Note on Tyroglyphid mite species on cheese in New Zealand. **The New Zealand Journal of Science and Technology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 486, 1946.

ROBINSON, R. C.; NIELSEN, S. D.; DALLAS, D. C.; BARILE, D. Can cheese mites, maggots and molds enhance bioactivity? Peptidomic investigation of functional peptides in four traditional cheeses. **Food and Function**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 633–645, 2021.

SÁNCHEZ-BORGES, M.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Hidden allergens and oral mite anaphylaxis: the pancake syndrome revisited. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 337–343, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26110684>.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; ÁLVAREZ-ALFAGEME, F.; CASTAÑERA, P. Development and survival of the cheese mites, *Acarus farris* and *Tyrophagus neiswanderi* (Acari: Acaridae), at constant temperatures and 90% relative humidity. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 64–72, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022474X0500086X>.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; ÁLVAREZ-ALFAGEME, F.; CASTAÑERA, P. Reproduction, longevity and life table parameters of *Tyrophagus neiswanderi* (Acari: Acaridae) at constant temperatures. **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 213–226, 2007.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; CASTAÑERA, P. Chemical and physical methods for the control of the mite *Acarus farris* on Cabrales cheese. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 61–66, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022474X08000763>.

SHINTU, L.; CALDARELLI, S. High-resolution MAS NMR and chemometrics: Characterization of the ripening of parmigiano reggiano cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 4026–4031, 2005.

SILVESTRE, B. T.; RABELO, É. M. L.; VERSIANI, A. F.; DA FONSECA, F. G.; SILVEIRA, J. A. G.; BUENO, L. L.; FUJIWARA, R. T.; RIBEIRO, M. F. B. Evaluation of humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1a from *Anaplasma marginale* using carbon nanotubes

as a carrier molecule. **Vaccine**, [s. l.], v. 32, n. 19, p. 2160–2166, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.062>.

SOLARZ, K.; PAJAŁ, C. Risk of exposure of a selected rural population in South Poland to allergenic mites. Part I: indoor acarofauna of one-family houses. **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 375–386, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-019-00352-w>.

SOUSA, S. A. A.; MAGALHÃES, A.; FERREIRA, M. M. C. Optimized bucketing for NMR spectra: Three case studies. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s. l.], v. 122, p. 93–102, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.01.006>.

STEJSKAL, V.; HUBERT, J.; AULICKY, R.; KUCEROVA, Z. Overview of present and past and pest-associated risks in stored food and feed products: European perspective. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 64, p. 122–132, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2014.12.006>.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 463–471, 1963.

VOGEL, P.; DAL BOSCO, S. M.; FERLA, N. J. Mites and the Implications on Human Health. **Nutricion Hospitalaria**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 944–951, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25617585>.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 10, 2009.

WEBER, M.; SCHÜNEMANN, W.; FUSS, J.; KÄMPFER, P.; LIPSKI, A. *Stenotrophomonas lactitubi* sp. nov. and *Stenotrophomonas indicatrix* sp. nov., isolated from surfaces with food contact. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 1830–1838, 2018.

WENNINGER, E. J.; EMMERT, S. Y.; TINDALL, K.; DING, H.; BOETEL, M. A.; RAJABASKAR, D.; EIGENBRODE, S. D. Aggregation Behavior and a Putative Aggregation Pheromone in Sugar Beet Root Maggot Flies (Diptera: Ulidiidae). **Journal of Insect Science**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–19, 2017.

WILKIN, D. R. Resistance to lindane in *Acarus siro* from an English cheese store. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 101–104, 1973.

ZHAO, Y.; ABBAR, S.; AMOAH, B.; PHILLIPS, T. W.; SCHILLING, M. W. Controlling pests in dry-cured ham: A review. **Meat Science**, [s. l.], v. 111, p. 183–191, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.09.009>.

ZHAO, Y.; ABBAR, S.; PHILLIPS, T. W.; SCHILLING, M. W. Phosphine fumigation and residues in dry-cured ham in commercial applications. **Meat Science**, [s. l.], v. 107, p. 57–63, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.008>.

ZHAO, Y.; ABBAR, S.; PHILLIPS, T. W.; WILLIAMS, J. B.; SMITH, B. S.; SCHILLING, M. W. Developing food-grade coatings for dry-cured hams to protect against ham mite infestation. **Meat Science**, [s. l.], v. 113, p. 73–79, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.11.014>.

ZHAO, Y.; XU, Y.; LI, J.; FAN, W.; JIANG, W. Profile of volatile compounds in 11 brandies by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 74, n. 2, 2009.