UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Caracterização microbiológica do queijo minas artesanal comercializado em São Paulo: segurança, higiene e diversidade microbiana.

Josisleine Recalde Allaion Ferreira

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Bernadette D. G. de Melo Franco

São Paulo
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Caracterização microbiológica do queijo minas artesanal comercializado em São Paulo: segurança, higiene e diversidade microbiana.

Josisleine Recalde Allaion Ferreira

(Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018)

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Bernadette D. G. de Melo Franco

São Paulo
2020

JOSISLEINE RECALDE ALLAION FERREIRA

Caracterização microbiológica do queijo minas artesanal comercializado em São Paulo: segurança, higiene e diversidade microbiana.

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do título de mestre

Profa. Dra. Bernadette D. G. de Melo Franco
Orientadora/Presidente

BANCA EXAMINADORA

Dra. Mariza Landgraf - FCF/USP

1º Examinador

Dr. Luís Augusto Nero - UFV/Externo

2º Examinador

Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira - FCF/USP

3º Examinador

São Paulo, 10 de Novembro de 2020.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Ferreira, Josisleine Recalde Allaion
F383c Caracterização microbiológica do queijo minas artesanal comercializado em São Paulo: segurança, higiene e diversidade microbiana / Josisleine Recalde Allaion Ferreira. -- São Paulo, 2020.
88p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Queijo minas artesanal. 2. Segurança microbiológica. 3. Diversidade microbiana. I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.

RESUMO

FERREIRA, J. R. A. **Caracterização microbiológica do queijo minas artesanal comercializado em São Paulo: segurança, higiene e diversidade microbiana**. 2020. 88p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Existe no Brasil uma grande variedade de queijos que se enquadram no conceito de "queijo minas artesanal". Produtores consideram que a legislação que regula o setor, em níveis municipal, estadual e federal, é confusa e excessivamente rigorosa, dificulta a padronização dos produtos, interfere no crescimento do setor e facilita a comercialização de queijos em desacordo com os padrões de higiene e segurança estabelecidos. Este trabalho de pesquisa de mestrado pretendeu gerar dados sobre as condições higiênico-sanitárias e segurança microbiológica de queijos minas artesanal, produzidos em Minas Gerais e coletados no comércio da cidade de São Paulo, bem como contribuir com informações a respeito da diversidade bacteriana nos queijos estudados. Foram estudadas 100 amostras de queijo minas artesanal coletadas no comercio de São Paulo, que foram submetidas à enumeração de microrganismos indicadores de higiene (coliformes, *Escherichia coli* e estafilococos), *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, empregando técnicas convencionais de cultivo e também moleculares. Os estafilococos coagulase positivos foram estudados quanto à tolerância à biocidas de interesse para alimentos, determinando-se também a diversidade microbiana, utilizando-se Next Generation Sequencing em Illumina MiSeq. Os resultados indicaram baixa ocorrência dos patógenos estudados, e que 10% e 32% das amostras excederam os limites para *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva estabelecidos pelas legislações vigentes, respectivamente. Entre os estafilococos coagulase positiva, 37,7% foram tolerantes a algum dos biocidas testados, com maior prevalencia dos tolerantes ao cloreto de benzalcônio (75%). Quanto à diversidade bacteriana, os gêneros predominantes foram *Streptococcus* (32,7%), *Lactococcus* (30,6%) *e Corynebacterium* (15,6%). A microbiota bacteriana detectada nos queijos Canastra estudados não apresentou dissimilaridade quando comparada à microbiota bacteriana de outros queijos Canastra coletados nos locais de produção em outro estudo. Observou-se que as regiões de coleta dos queijos na cidade de São Paulo e os pontos de comercialização em São Paulo apresentam maior influência sobre a microbiota detectada para o queijo minas artesanal do que as regiões de produção ($p<0,05$), sugerindo a interferencia das práticas de manipulação após a produção na diversidade bacteriana detectada nos queijos.

Palavras-chave; Queijo minas artesanal. Higiene. Segurança microbiológica. Diversidade bacteriana**.**

ABSTRACT

FERREIRA, J. R. A. **Microbiological characterization of artisanal minas cheese marketed in São Paulo: safety, hygiene and microbial diversity.** 2020. 88p. Thesis (MS) - School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

There is a wide variety of cheeses in Brazil that fit the concept of “artisanal minas cheese”. Producers consider that the legislation that regulates the sector, at municipal, state and federal levels, is confusing and excessively strict, hinders the standardization of products, interferes with the growth of the sector and facilitates the marketing of cheeses in disagreement with the hygiene and safety standards. This master's research work aimed to generate data on the hygienic-sanitary conditions and microbiological safety of artisanal Minas cheeses, produced in Minas Gerais and collected in São Paulo's commerce, as well as to contribute with information about the bacterial diversity in the studied cheeses. One hundred samples of artisanal Minas cheese collected in the São Paulo market were subjected to the enumeration of hygiene indicator microorganisms (coliforms, Escherichia coli and staphylococci), *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*, using conventional cultivation and also molecular techniques. Coagulase positive staphylococci were studied for tolerance to biocides of interest to food, and microbial diversity was also determined using Next Generation Sequencing in Illumina MiSeq. The results indicated a low occurrence of the studied pathogens, and that 10% and 32% of the samples exceeded the limits for *Escherichia coli* and coagulase positive staphylococci established by the current legislation, respectively. Among the coagulase positive staphylococci, 37.7% were tolerant to at least one of the tested biocides, with a greater prevalence of those tolerant to benzalkonium chloride (75%). As for microbial diversity, the predominant genera were *Streptococcus* (32.7%), *Lactococcus* (30.6%) and *Corynebacterium* (15.6%). The bacterial microbiota detected in the studied Canastra cheeses showed no dissimilarity when compared to the bacterial microbiota of other Canastra cheeses collected at the production sites in another study. It was observed that the cheese collection regions in the city of São Paulo and the marketing points in São Paulo had a greater influence on the detected bacterial microbiota than the production regions ($p < 0.05$), suggesting the interference of the practices of manipulation after production in the bacterial diversity detected in the cheeses.

Key words; Artisanal Minas cheese. Hygiene. Microbiological safety. Bacterial diversity.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo nº 2018/02630-5, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001”.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe,
por toda a compreensão e apoio durante o mestrado.

Ao meu pai,
por todo o esforço em sua vida para garantir-me o melhor acesso aos estudos e por ter me ensinado à amar o conhecimento (In memoriam).

A minha orientadora,
por sua presença marcante, tanto pessoal quanto profissional em minha vida.

Aos meus tutores na Espanha,
que gentilmente aceitaram me orientar no projeto e cederam suas instalações, produtos e processos para a parte experimental.

Ao meu colega William Isidorio por todo o treinamento com as análises de sequenciamento e auxilio com os programas de estatística, o que foi imprescindível para o êxito do meu projeto.

Aos meus outros colegas de laboratório do Brasil e Espanha,
pela companhia e por sempre compartilharem seu conhecimento.

A todos,
Que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **10**

1.1 Aspectos gerais do queijo minas artesanal 11

1.2 Aspectos legais para a produção e comercialização de queijo minas artesanal . 12

1.3 Microbiota do queijo minas artesanal 19

1.3.1 Bactérias láticas 19

1.3.2 Bactérias patogênicas 21

1.3.3 Bactérias indicadoras de condições higiênico-sanitárias 25

1.4 Biocidas 26

1.5 Diversidade microbiana nos queijos artesanais 31

1.6 Desafios 32

2 OBJETIVO GERAL **33**

2.1 Objetivos específicos 34

3 MATERIAL E MÉTODOS **35**

3.1 Amostragem 36

3.2 Análises microbiológicas 38

3.2.1 Preparo das amostras de queijo para análises 38

3.2.2 Pesquisa de *Salmonella* spp 38

3.2.2.1 Testes fenotípicos 38

3.2.2.2 Testes moleculares 39

3.2.2.2.1 Para complementação dos resultados de *Salmonella* spp. nos testes fenotípicos 39

3.2.2.2.2 Para pesquisa de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real direto do caldo de pré-enriquecimento 40

3.2.3 Pesquisa de Listeria monocytogenes 41

3.2.3.1 Testes fenotípicos 41

3.2.3.2 Testes moleculares 41

3.2.3.2.1 Para complementação dos resultados de *L. monocytogenes* nos testes fenotípicos 41

3.2.3.2.2 Para Pesquisa de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real direto do caldo de pré-enriquecimento 42

3.2.4 Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* 43

3.2.5 Estudos com estafilococos coagulase positiva 43
3.2.5.1 Enumeração dos isolados 43
3.2.5.2 Identificação da espécie dos isolados de estafilococos 44
3.2.5.3 Avaliação da tolerância dos estafilococos à biocidas 45
3.2.5.3.1 Testes fenotípicos 45
3.2.5.3.2 Pesquisa dos genes de bomba de efluxo *qacA/B* e *smr* (*qacC/D*) 46
3.3 Avaliação da diversidade bacteriana nos queijos estudados 47
3.3.1 Preparo das amostras para análise e extração de DNA 47
3.3.2 Amplificação do 16S rDNA e preparo de biblioteca de sequenciamento 47
3.3.3 Construção das figuras e análises estatísticas dos resultados 50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
4.1 Positividade para *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* 52
4.2 Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* 57
4.3 Estudos com estafilococos coagulase positiva 61
4.4 Não conformidades com as legislações federal e estadual 66
4.5 Diversidade bacteriana nos queijos estudados 68
4.5.1 Panorama geral da microbiota do queijo minas artesanal 68
4.5.2 Co-variáveis analisadas que podem influenciar a microbiota bacteriana dos queijos artesanais 71
4.5.3 Comparação da diversidade bacteriana entre queijos Canastra coletados no comércio em São Paulo e queijos Canastra coletados nas fazendas produtoras em Minas Gerais 72
5 CONCLUSÕES 73
6 REFERÊNCIAS 75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do queijo minas artesanal

O queijo minas artesanal é um dos muitos tipos de queijos produzidos em Minas Gerais. De acordo com o Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), o queijo minas artesanal é, obrigatoriamente, produzido com leite integral fresco e sem tratamento térmico, em propriedade com atividade de pecuária leiteira. Também recebe a adição de cultura lática natural, que pode ser o “pingo”, correspondente ao soro fermentado que 'pinga' na mesa de escorrer queijo e é reaproveitado na produção do dia seguinte, ou a ‘rala’, correspondente ao queijo maturado ralado, produzido em um lote anterior, adicionado ao novo lote como fermento. Além disto, a massa do queijo também não passa por tratamento térmico (IPHAN, 2014).

O processo de produção do queijo minas artesanal compreende as seguintes fases: obtenção do leite por ordenha manual ou mecânica de vacas de curral coberto e com piso de alvenaria, filtração do leite através de tecido lavado e desinfetado, adição de culturas láticas naturais e coalho natural proveniente do estomago de bezerro ou industrial (pepsina ou renina), coagulação por até 90 minutos, corte da massa após atingir a consistência de coalhada, mexedura, dessoragem e separação da massa, enformagem em formas com 13 a 15 cm de diâmetro, prensagem manual para dessoragem da massa, primeira salga da massa com sal grosso seguida de 6 a 12 h de descanso, viragem e segunda salga na outra face do queijo seguida de 12 h de descanso, lavagem, retirada dos queijos das formas após 48 h e transferência para prateleiras para maturação por 14 a 22 dias, dependendo da região produtora. A finalização compreende um acabamento estético, que pode ser grossagem ou ralação no caso de queijos da região do Serro ou uso de lixas, como nos queijos da Serra da Canastra (IPHAN, 2014).

O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) reconhece sete microrregiões tradicionais produtoras de queijo minas artesanal em Minas Gerais: Serro, Canastra, Araxá, Cerrado, Campos das Vertentes, Triângulo Mineiro e Serra do Salitre, que produzem queijos com certificação de origem (SANT’ANNA et al., 2019). Estes queijos são produzidos há mais de 200 anos, apresentando grande valor econômico e cultural. O modo artesanal de fazer queijo em Minas Gerais é considerado um patrimônio cultural imaterial brasileiro, conforme tombamento concedido em 15 de maio de 2008 pelo Conselho Consultivo do IPHAN (IPHAN, 2014).

Ainda na linha de reconhecimento e valorização do queijo minas artesanal, o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) concedeu o título de Indicação Geográfica (IG) a onze municípios da região do Serro e a sete municípios da região da Canastra, reconhecendo assim esses municípios como referência na fabricação de queijo artesanal tipo Serro e tipo Canastra, respectivamente. A concessão do selo IG reconhece o queijo minas artesanal como uma iguaria nacional, e fortalece a produção dos pequenos produtores dessas microrregiões, resultando em produtos de melhor qualidade (EMATER, 2011; EMATER, 2016).

1.2 Aspectos legais para a produção e comercialização de queijo minas artesanal

A legislação brasileira que regulamenta a produção e comercialização de queijos fabricados com leite cru é complexa e gera muitas controvérsias no setor queijeiro.

A **Lei Federal 1.283**, de 18 de dezembro de 1950, foi a primeira a estabelecer a obrigatoriedade de fiscalização, sob o ponto de vista industrial e sanitário, da produção e comercialização de todos os produtos de origem animal no Brasil. Para que esta lei fosse executada plenamente, foi criado o RIISPOA (Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal), através do **Decreto Federal 30.691/1952**, estabelecendo um conjunto de regras e parâmetros para este fim (BRASIL, 1950; BRASIL, 1952).

O **RIISPOA** estabeleceu que somente queijos elaborados com leite pasteurizado ou submetido a outro tratamento térmico e submetidos à maturação de pelo menos 10 dias poderiam ser comercializados. Além da questão do uso do leite com tratamento térmico, o RIISPOA determinou também que as queijarias deveriam se enquadrar nos padrões industriais e sanitários estabelecidos, de forma a ter a autorização para funcionamento concedida pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 1952; BRASIL, 1962). No entanto, as regras de controle industrial e sanitário do RIISPOA não levavam em conta as práticas adotadas no país na produção de queijo artesanal. Como consequência, os pequenos produtores de queijos artesanais encontravam muitas dificuldades, principalmente de natureza econômica, para enquadramento na legislação, dificultando a comercialização de seus produtos.

Em 23 de novembro de 1989, a Lei Federal 1.283/1950 foi alterada pela **Lei Federal 7.889/1989**, que estabeleceu que a inspeção sanitária e industrial dos

produtos de origem animal seria de competência da União, Estados, Distrito Federal e Municípios, determinando ainda que nenhum estabelecimento industrial ou entreposto de produtos de origem animal poderia funcionar no país sem ter o registro no órgão competente de fiscalização da sua atividade. Estabeleceu também barreiras geográficas como limitante comercial, ou seja, uma empresa registrada no Serviço de Inspeção Municipal (SIM) do município “A” não poderia expor à venda seus produtos no município “B”, o mesmo acontecendo com os Serviços Estaduais de Inspeção (SIE), que estabeleceram limites territoriais estaduais como barreira ao comércio (BRASIL, 1989).

Devido à necessidade de leis específicas para o queijo artesanal, que levassem em conta as características peculiares de fabricação dos queijos, principalmente o uso de leite sem tratamento térmico, e que facilitassem o comércio além das barreiras geográficas, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) elaborou várias normas, portarias e resoluções, porém gerou um problema legal do ponto de vista hierárquico das leis, tendo em vista as orientações das técnicas legislativas, que também são aplicáveis ao executivo, previstos na **Lei Complementar 95**, de 26 de fevereiro de 1998. Este foi o caso da **Portaria 146**, de 7 de março de 1996, que passou a permitir que queijos brasileiros fossem produzidos com leite não pasteurizado ou sem nenhum outro tratamento térmico, desde que fossem submetidos a uma maturação de 60 dias no mínimo (BRASIL, 1996, BRASIL, 1998). O uso de leite sem tratamento térmico e o longo tempo de maturação do queijo estavam em desacordo com as normas do **RIISPOA**.

Em 2000, a **Resolução 7**, de 28 de novembro de 2000, do MAPA, foi a primeira a estabelecer os requisitos de instalações, funcionamento e higiene de produção dos produtores de queijo artesanal, particularmente do Queijo Minas do Serro, Queijo Minas Araxá, e Queijo Minas Canastra. Esta resolução estabeleceu também que as queijarias artesanais só poderiam funcionar se estivessem “sob relacionamento no SIF para manipulação de leite da própria fazenda”, devendo ser filiadas à entrepostos de laticínios registrados no SIF para complementar o preparo do produto, ou seja, maturação, embalagem e rotulagem (BRASIL, 2000). Esta exigência de registro nos entrepostos registrados no SIF constituiu um entrave adicional para o setor, causando novamente um problema de “hierarquia entre leis”, pois estava em desacordo com a Lei 7.889 de 1989, que havia delegado a inspeção

dos produtos de origem animal para a União, Estados, Distrito Federal e Municípios. Além disto, a exigência de 60 dias para maturação não foi alterada.

Com a finalidade de resguardar o modo tradicional histórico e cultural da produção do queijo minas artesanal pelos produtores rurais, o governo do Estado de Minas Gerais publicou em 2002 a **Lei Estadual 14.185**, permitindo a elaboração de queijo minas artesanal com leite sem tratamento térmico, mas mantendo a exigência de um período mínimo de 60 dias de maturação para comercialização dos queijos dentro do Estado de Minas Gerais, para as queijarias certificadas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Além disto, a lei estabeleceu o IMA como o órgão fiscalizador das queijarias, descentralizando assim a fiscalização pelo SIF, que havia sido estabelecida pela Resolução 7/2000 (MINAS GERAIS, 2002).

Devido às muitas divergências entre as leis federais e estaduais e seus atos normativos no que se refere ao órgão responsável pela inspeção de produtos de origem animal, em 2006 foi criado o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), através do **Decreto Federal 5.741,** de 30 de março de 2006 (BRASIL, 2006), que transferiu para os estados e municípios (ou regiões) a responsabilidade pelas atividades de sanidade agropecuária, desde que estes tenham comprovação da equivalência dos Serviços de Inspeção ao Serviço de Inspeção Federal (SIF). Esta descentralização da inspeção facilitou o comércio nacional dos produtos submetidos à inspeção estadual ou municipal.

Em 2008, o Estado de Minas Gerais publicou o **Decreto Estadual 44.864,** que alterou a lei 14.185/2002, permitindo a comercialização dos queijos artesanais com período de maturação inferior a 60 dias, mas limitou a circulação do produto ao Estado de Minas Gerais apenas, além de determinar critérios microbiológicos para os queijos artesanais (MINAS GERAIS, 2008).

No sentido de respeitar as especificidades regionais dos produtos e das diferentes escalas de produção, incluindo a agroindústria rural de pequeno porte, em 2010 foi publicado o **Decreto Federal 7.216**, contendo normas específicas relativas às condições gerais das instalações e equipamentos de uso na produção. Este decreto deu poderes ao MAPA de reconhecer, a qualquer momento, a equivalência dos Serviços de Inspeção dos Estados, Municípios e Distrito Federal ao Sistema de Inspeção Federal, ou seja, o decreto deu autonomia aos Serviços de Inspeção com reconhecimento de equivalência para indicação de novos estabelecimentos a se integrarem ao SisBI-POA, cujos produtos podem ser comercializados em todo o

território nacional (BRASIL, 2010a). No mesmo ano, o MAPA, através da **Portaria 100** de 17 de março de 2010, reconheceu a equivalência do Serviço de Inspeção Estadual (SIE) realizado pelo IMA ao SIF, autorizando o IMA a fazer parte do SisBI-POA (BRASIL, 2010b).

Ainda em relação ao tempo de maturação, o MAPA publicou a **Instrução Normativa 57,** de 15 de dezembro de 2011, que permitiu que os queijos artesanais elaborados com leite não pasteurizado fossem maturados por um período inferior a 60 dias, “desde que estudos técnico-científicos comprovassem que não havia comprometimento da qualidade e inocuidade do produto”. No entanto, esta Instrução Normativa levantou novas questões preocupantes, pois restringiu o território de produção às regiões com Indicação Geográfica certificada ou tradicionalmente reconhecidas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária e tornou obrigatórios exames de rotina em laboratórios específicos, presentes em apenas dois municípios de Minas Gerais e que se situam geograficamente muito distantes de áreas com Indicação Geográfica (BRASIL, 2011).

Em 2012, a **Lei Estadual 20.549/2012**, de Minas Gerais, revogou a Lei Estadual 14.185/2002 (MINAS GERAIS, 2012). Além de estabelecer as normas para a construção e funcionamento das queijarias, a nova Lei Estadual deu poderes ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) de credenciamento de associações ou cooperativas para auxiliar na verificação de conformidade da produção dos queijos artesanais. A Lei Estadual 20.549/2012 estabeleceu que os queijos artesanais produzidos em uma determinada região podem receber uma ‘denominação de origem” desde que o IMA aprove um protocolo de produção, e também descentralizou a concessão de autorização para a comercialização do queijo artesanal, permitindo que órgãos de controle sanitário do Estado ou o Serviço de Inspeção Municipal (SIM) auditado pelo Estado concedessem essa autorização, desde que estivem de acordo com o Decreto Federal 7.216 de 2010.

Com o objetivo de estimular o cadastro dos produtores de queijos artesanais no órgão de controle sanitário do Estado, a Lei Estadual 20.549/2012 criou a figura do “termo de compromisso”, que permite que um produtor tenha autorização para comercializar os queijos durante um determinado período, que pode ser ampliado de acordo com o cumprimento das metas, até que o mesmo consiga a habilitação sanitária definitiva, desde que resguarde a saúde pública. E segundo a referida lei, o período de maturação deve ser estabelecido pelo regulamento do município de

origem, e em sua ausência, o período de maturação deve ser suficiente para que não se constate o dessoramento (MINAS GERAIS, 2012).

Em 2013, a Instrução Normativa IN 57/2011 foi revogada com a publicação da **Instrução Normativa IN 30**/2013, que exigiu que “os estudos técnico-científicos relacionados ao período de maturação” sejam avaliados por algum órgão estadual ou municipal de inspeção industrial e sanitária reconhecido pelo Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SisBI-POA) (BRASIL, 2013).

Com base em estudos técnico-científicos, o IMA, através da **Portaria 1.305** de 30 de abril de 2013, liberou o período de maturação dos queijos das microrregiões do Serro para um mínimo de 17 dias e das microrregiões da Canastra, Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes para um mínimo de 22 dias, até que novas pesquisas indiquem que o tempo de maturação pode ser diminuído ainda mais, sem comprometimento da segurança microbiológica (IMA, 2013). Além disso, esta Portaria estabeleceu que, para cadastro no IMA, as propriedades queijeiras deveriam ter implementadas as Boas Práticas de Fabricação e as Boas Práticas Agropecuárias, normatizadas por três portarias: **Portaria Nº 517/2002**, que estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores do leite utilizado na produção; **Portaria Nº 518/2002**, que dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos e **Portaria Nº 523/2002**, que estabelece normas sobre as condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de manipulação e fabricação (IMA, 2013).

Em 2017, foi promulgado o **Decreto Federal 9.013**, que corresponde ao novo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), e que atualiza as leis federais 1.283/1950 e 7.889/1989 e revoga os Decretos 30691/1952 (antigo RIISPOA) e 1.255/1962 (BRASIL, 2017). Apesar da grande espera pela atualização do antigo RIISPOA, datado da década de 50, o § 6º do artigo 373 no Decreto Federal 9.013 manteve o prazo de maturação queijos artesanais elaborados com leite sem tratamento térmico em um mínimo de 60 dias, reforçando o estabelecido na antiga Portaria 146/1996 do MAPA. Por outro lado, o novo RIISPOA delegou a inspeção dos produtos de origem animal aos Estados conveniados ao SisBI-POA, desde que a equivalência dos serviços estaduais e o serviço federal seja reconhecida (BRASIL, 2017).

Em 2018, Estado de Minas Gerais promulgou a **Lei Estadual 22.920**, permitindo que as análises de rotina sejam realizadas em laboratório na propriedade produtora ou em laboratório oficial ou credenciado por órgão ou entidade de controle

e de defesa sanitária, e não apenas nos laboratórios especificados na IN 57/2011 (MINAS GERAIS, 2018a).

Em junho de 2018, o **Decreto Federal 13.680** alterou a Lei Federal 1.283/1950, com o acréscimo do artigo 10-A, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Este Decreto passou a permitir a comercialização interestadual de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal, com características e métodos tradicionais ou regionais próprios, desde que empregadas as boas práticas agropecuárias e de fabricação, com fiscalização dos órgãos de saúde pública dos Estados e do Distrito Federal. Também determinou que os produtos artesanais comercializados em território nacional devem estar identificados com um selo com a indicação ARTE (BRASIL, 2018a). O Selo ARTE objetiva dar ao consumidor segurança de que o processo de produção é artesanal, que apresenta as características tradicionais próprias, que atende às boas práticas agropecuárias e de fabricação e que tem segurança sanitária. Até a regulamentação do Decreto Federal 13.680, a comercialização dos produtos artesanais de origem animal produzidos de forma artesanal estava temporariamente autorizada (BRASIL, 2018a).

No final de 2018, o Estado de Minas Gerais promulgou a **Lei Estadual 23.157**, que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, revogando a lei 20.549, de 2012, que limitava a produção e comercialização de apenas um tipo de queijo artesanal, o “queijo minas artesanal”. Segundo a Lei Estadual 23.157/2018, o poder executivo pode definir diferentes tipos de produtos alimentícios, e os produtores podem criar variações, com adição de ingredientes, desde que a qualidade do produto não seja comprometida. O objetivo dessa lei foi estimular a diversificação dos produtos e ampliar o mercado (MINAS GERAIS, 2018b).

A Lei Estadual 23.157/2018 define como artesanal aquele queijo elaborado com leite integral fresco e cru, apresentando características de identidade e qualidade específicas. Essa lei permite o uso de leite proveniente de outras fazendas, desde que possuam a habilitação sanitária emitida pelo órgão ou por alguma entidade competente de controle e defesa sanitária, atestando o relacionamento entre o produtor de leite e a queijaria. Segundo a lei, cabe à Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SEAPA), entre outras atribuições, coordenar, gerir e acompanhar as ações e atividades relacionadas aos queijos artesanais,

garantindo a preservação das suas características de identidade e promovendo o reconhecimento da produção do queijo artesanal como patrimônio imaterial, sociocultural e econômico do povo mineiro. Segundo esta lei, o IMA é responsável por regulamentar os diferentes tipos de queijo artesanal, habilitar as queijarias, entrepostos e estabelecimentos rurais, inspecionar, fiscalizar e editar normas complementares. Ainda segundo a lei, os queijos artesanais produzidos no estado de Minas Gerais devem ser comercializados por queijarias habilitadas ou entrepostos habilitados, podendo os queijos artesanais identificados com o Selo ARTE serem comercializados em outros estados ou Distrito Federal (MINAS GERAIS, 2018b).

Em 2019, a **Lei Federal 13.860** regulamentou a elaboração e a comercialização de queijos artesanais de todo o país, com os seguintes destaques: considera-se artesanal o queijo elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, conforme protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, e com emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação. O tempo de cura do queijo feito a partir de leite cru deve ser definido com base no processo tecnológico de produção de cada variedade de queijo, de acordo com suas características. A fabricação de queijos artesanais a partir de leite cru restringe-se à queijarias situadas em estabelecimentos rurais certificados como livre de tuberculose e brucelose, ou controlados para brucelose e tuberculose por órgão estadual de defesa sanitária animal. Segundo a lei, os procedimentos e processos de controle de boas praticas, fiscalização e rastreabilidade podem ser simplificados para os produtores de pequeno porte (BRASIL, 2019a).

O **Decreto Federal 9.918,** publicado também em 2019, regulamentou o artigo 10-A da Lei Federal 1.283, passando a permitir a comercialização interestadual de alimentos produzidos de forma artesanal desde que sejam portadores do Selo ARTE (BRASIL, 2019b).

Vale ressaltar que a Lei Federal 13.860 e o Decreto Federal 9.918 atendem uma antiga demanda dos produtores rurais e consumidores de produtos artesanais, pois reconhecem que existem dois tipos muito diferentes de produtos de origem animal: o industrial e o artesanal, sendo que ambos necessitam de regulamentação própria (BRASIL, 2019a; BRASIL, 2019b).

De acordo com o exposto, é possível observar que a legislação brasileira relativa a esses queijos é confusa pois é dividida em vários níveis (municipal, estadual e federal), nem sempre obedecendo a hierarquia legal. O setor queijeiro considera

que a legislação é excessivamente rigorosa, dificulta a padronização dos produtos, confunde o produtor e interfere no crescimento do setor. Dessa forma, é razoável imaginar que muitos queijos minas artesanal comercializados no país estejam em desacordo com essas leis, podendo oferecer riscos para a saúde dos consumidores.

1.3 Microbiota do queijo minas artesanal

A microbiota de um alimento corresponde à comunidade microbiana presente, que compreende microrganismos desejáveis e indesejáveis, que podem ser deteriorantes ou patogênicos (BUTTON e DUTTON, 2012). A microbiota dos queijos minas artesanal pode ser muito diversa, por serem produzidos com leite cru e com culturas láticas naturais, e ser influenciada pelas características ambientais de cada região produtora e também pelas condições de produção de cada queijaria (KAMIMURA et al., 2019). A diversidade de espécies presentes nos queijos pode oscilar sazonalmente e variar dentro de sub-regiões produtoras de um mesmo tipo de queijo (FILIPPIS et al., 2014).

As bactérias láticas são as que predominam em queijos minas artesanais, sendo consideradas microrganismos desejáveis nestes produtos (ARCURI et al., 2013; BORELLI et al., 2006; CASTRO, 2016; LACERDA et al., 2011; ORTOLANI et al., 2010; PERIN et al., 2015; PERIN et al., 2017). Outros microrganismos encontrados em queijos minas artesanal são aqueles associados às condições higiênico-sanitárias de produção, como os coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. que podem causar a deterioração do queijo, e os microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* spp produtores de enterotoxinas, capazes de comprometer a segurança e causar danos à saúde do consumidor (BORELLI et al., 2006, MONTEL et al., 2014; OMBARAK et al., 2016).

1.3.1 Bactérias láticas

As bactérias láticas (BAL) são naturalmente encontradas em habitats ricos em nutrientes (GARCIA et al., 2016), fazendo parte da microbiota dos tratos gastrintestinal, respiratório superior e urogenital inferior de diferentes espécies animais (RESENDE et al., 2011).

As BAL são Gram positivas, apresentando-se como bastonetes ou cocos não esporulados, podendo ser aeróbias, microaerófilas ou anaeróbias facultativas. A

maioria é inativada a temperaturas superiores a 70° C (GOMAND et al., 2019). Utilizam preferencialmente a lactose como fonte de carbono, e realizam dois tipos de fermentação: homofermentativa, com produção predominantemente de ácido lático a partir da lactose, ou heterofermentativa, quando outras substâncias, além do ácido lático, como o ácido acético, dióxido de carbono e etanol, são produzidas durante a fermentação da lactose (GHOSH et al., 2019).

Devido à capacidade das BAL metabolizarem substratos por vias metabólicas clássicas, a indústria de produtos lácteos utiliza estas bactérias como culturas iniciadoras ou adjuntas para obtenção de vários produtos, como leites fermentados, queijos e soro de queijo. As BAL são também empregadas para a redução do teor de lactose e melhorias nas características tecnológicas (sensorial, física e química) em muitos produtos lácteos (JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014).

As comunidades de BAL em queijos são formadas principalmente por lactobacilos mesófilos, como *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* e ainda podem apresentar espécies de *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (BERESFORD et al., 2001; CALLON; MILLET; MONTEL, 2004). Com base em novos estudos de sequenciamento genômico, a taxonomia de *Lactobacillus* foi recentemente atualizada, com a introdução de 23 novos gêneros e união das famílias Lactobacillaceae e Leuconostocaceae (Zheng et al, 2020).

Nos queijos minas artesanal, as BAL são responsáveis pela acidificação durante a coagulação e maturação, e pelas características sensoriais de textura, sabor e aroma, podendo desempenhar também um papel probiótico (ARCURI et al., 2013; BORELLI et al., 2006; CASTRO et.al., 2016; LACERDA et al., 2011; MONTEL et al., 2014; ORTOLANI et al., 2010; PERIN et al., 2015; PERIN et al., 2017). Muitas BAL exercem diversos efeitos positivos na saúde humana, como controle de infecções e imunomodulação, além de redução dos níveis plasmáticos de colesterol, da intolerância a lactose e da ocorrência de alergias alimentares (GHOSH et al., 2019).

As BAL podem sintetizar muitos compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos (principalmente ácido lático), dióxido de carbono, diacetil, acetaldeido, peroxido de hidrogênio e bacteriocinas, que podem inibir a multiplicação dos microrganismos deteriorantes e patogênicos (COSTA et.al., 2018) como *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018).

1.3.2 Bactérias patogênicas

Os queijos produzidos com leite cru podem conter bactérias patogênicas e/ou toxinas microbianas quando as Boas Práticas de Agricultura, Ordenha e Fabricação não são seguidas, tornando seu consumo uma importante questão de saúde pública (MONTEL et al., 2014; OMBARAK et al., 2016), devido expor o consumidor a agentes patogênicos, como *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella spp, Listeria monocytogenes* (DOS SANTOS et al., 2017).

***Salmonella* spp.:** É um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae, que compreende bactérias Gram negativas não esporogênicas, anaeróbias facultativas, normalmente móveis, produtoras de gás a partir de glicose e oxidase negativas. A temperatura de multiplicação varia entre 5 e 46º C, com ótima entre 35 e 43º C. O pH de multiplicação varia entre 3,8 e 9,5, com ótimo entre 7,0 e 7,5. A atividade de água mínima para multiplicação é 0,94 (TRABULSI; ALTERTHUM, 2016).

Existem mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella* já descritos, sendo a maioria patogênica para o homem, apresentando diferenças de sintomatologia em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade e de fatores relativos ao individuo afetado (ALMEIDA, 2015; TRABULSI; ALTERTHUM, 2016).

As doenças causadas por *Salmonella* são a febre tifoide causada por *Salmonella* Typhi, a febre entérica causada por *Salmonella* Paratyphi e as salmoneloses (gastroenterite) causadas pelos demais sorotipos de *Salmonella* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2016), cuja veiculação está associada à ingestão de água e alimentos contaminados. *Salmonella* pode atingir toda a cadeia de produção de alimentos, desde a matéria prima até os produtos finais. A contaminação cruzada é outra forma comum de contaminação de alimentos por *Salmonella* (FDA, 2012).

A salmonelose apresenta manifestação clínica gastroentérica, com sinais inespecíficos que podem ser mal diagnosticados (ALMEIDA, 2015). Em indivíduos saudáveis e com o sistema imunológico normal, a doença é auto-limitada, com taxa de mortalidade inferior a 1%. Crianças com idade inferior a 5 anos, pessoas idosas e pessoas com o sistema imunológico enfraquecido por uma condição médica (diabetes, doença hepática, renal, câncer, AIDS, por ex) têm maior probabilidade de desenvolver uma doença severa. Estima-se que a frequência de salmonelose nesta população especial é 20 vezes maior do que na população em geral, sendo comum os episódios de recorrência (FDA, 2012).

Salmonelose é uma das principais doenças de origem alimentar, considerada uma zoonose complexa que afeta a saúde pública tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (WHO, 2016). No Brasil, esse patógeno foi identificado em 35% dos surtos notificados causados por alimentos entre 2000 e 2017 (BRASIL, 2018b). Nos Estados Unidos, este patógeno também é citado como o agente mais frequentemente isolado de doenças transmitidas por alimentos (DTA), estimando-se que *Salmonella* spp. esteja envolvida em cerca de 1,2 milhão de casos todos os anos, com 19 mil hospitalizações e 450 mortes (CDC, 2020a). Na Europa, 100 mil casos são relatados todos os anos e em 2016 *Salmonella* foi a bactéria mais frequente nos surtos de origem alimentar (EFSA, 2020a).

Apesar do uso do leite não pasteurizado, a incidência reportada de *Salmonella* spp. em queijos minas artesanal é baixa (ARAUJO, 2004; MARTINS et al., 2014; PINTO et al., 2016), o que pode ter várias explicações. Uma delas é que esse patógeno pode estar presente em quantidades baixas e indetectáveis, ou mesmo desaparecer do produto quando a contaminação inicial é baixa ou quando há presença de microrganismos competidores (RESENDE et al., 2011).

***Listeria monocytogenes*:** É uma espécie da família *Listeriaceae* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2016). Trata-se de uma bactéria Gram positiva não esporogênica, móvel, anaeróbia facultativa e que requer a presença de um carboidrato para multiplicação. Produz ácido, mas não gás a partir da glicose e outros carboidratos, e é catalase positiva e oxidase negativa. Multiplica-se em uma faixa de pH entre 6,0 e 9,0. Tolera altas concentrações de sal, pode multiplicar-se entre 4º C e 50º C, sendo considerada psicrotrófica, mas não sobrevive à pasteurização (60º C/30 min) (GONZALES-BARRON et al., 2020).

L. monocytogenes é um microrganismo ubiquitário, encontrado em plantas, solo, águas superficiais, esgoto, silagem, resíduos de abatedouros, leite de vacas saudáveis e com mastite, fezes de humanos e animais e já foi descrito em bovinos, ovinos, caprinos, aves, suínos e animais silvestres. Devido à capacidade de formar biofilmes, é facilmente encontrado no ambiente de produção de alimentos (BUCHANAN et al., 2017).

A ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* pode causar dois tipos de doença, uma não invasiva, com sintomas típicos de gastroenterite e outra mais grave, que ocorre quando a infecção atinge a corrente sanguínea (septicemia) e

se espalha pelo sistema nervoso, incluindo o cérebro, resultando em meningite e outros problemas potencialmente fatais (FDA, 2012). Indivíduos não pertencentes aos grupos de risco podem apresentar gastroenterite, enquanto nos demais geralmente ocorre a forma mais grave. Os grupos de risco mais importantes são gestantes, neonatos, idosos e pessoas com o sistema imunológico comprometido (CDC, 2020b).

A gastroenterite causada por *L. monocytogenes* costuma ser auto-limitada, com sintomas leves, não requerendo tratamento ou hospitalização. A forma severa e invasiva está entre as principais causas de óbito por doenças de origem alimentar, tendo taxa de mortalidade entre 15 e 30%. Em casos de meningite, essa taxa pode chegar a 70%. No caso de septicemia, a média é de 50% e no caso de infecções perinatais ou neonatais, a taxa de mortalidade pode ser superior a 80% (FDA, 2012).

A dose infectante de *L. monocytogenes* para causar doença ainda não está bem determinada, estimando-se que esteja entre 10^3 e 10^9 células viáveis por grama ou mililitro (BARANCELLI et al., 2011). Os órgãos regulatórios nacionais e internacionais variam em relação ao rigor da exigência de ausência do patógeno em um alimento. No Brasil a legislação vigente determina ausência do patógeno em 25g do alimento (BRASIL, 2019c).

No Brasil, assim como em outros países, a listeriose é sub-diagnosticada e sub-notificada e esta falta de dados pode obscurecer a magnitude real do problema (GONZALES-BARRON et al., 2020). Nos Estados Unidos, há relatos de surtos de listeriose de origem alimentar associados ao leite cru e queijos produzidos com leite cru (CDC, 2020c). Na Europa, a incidência de listeriose aumenta a cada ano: só em 2016 foram relatados 2.536 casos e 247 mortes (EFSA, 2020b).

A preocupação com a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos produzidos com leite cru é mundial. No Brasil, a frequência de detecção de *L. monocytogenes* em queijos minas artesanal tem sido baixa (BRUMANO, 2016; MATA, 2009; ORNELLAS, 2005). Considerando que queijos artesanais são fabricados com leite cru, e que *L. monocytogenes* é um frequente contaminante ambiental, a baixa positividade detectada pode ser decorrente do uso de métodos analíticos de baixa sensibilidade ou da competição microbiana com as bactérias láticas presentes nos queijos (NERO et al., 2008; GONZALES-BARRON et al., 2020).

Estafilococos produtores de enterotoxinas: Os principais representantes com importância em alimentos são os estafilococos coagulase positiva, que incluem as

espécies *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Estas espécies são potencialmente patogênicas, e por esta razão, a reação da coagulase é utilizada como indicação de patogenicidade (SCHLEIFER; BELL, 2009). Dentre estas espécies, *S. aureus* é a mais relevante, pela capacidade de produzir enterotoxinas e por ser um dos agentes patogênicos mais envolvidos em surtos e casos esporádicos de intoxicação estafilocócica. Vale ressaltar que outras espécies, como *S. intermedius* e *S. hyicus,* também têm sido implicadas em surtos, mas estas duas espécies são coagulase variável (HENNEKINNE et al., 2010).

S. aureus é uma bactéria Gram positiva, imóvel, não esporogênica, de forma esférica e com divisão em mais de um plano, formando arranjos que lembram cachos de uvas. É anaeróbia facultativa, mas multiplica-se melhor em condições aeróbicas. É mesófila, multiplicando-se na faixa de 7 a 47,8º C, com ótimo a 35º C. A faixa de pH de multiplicação vai de 4,5 a 9,3, com ótimo entre 7,0 e 7,5. A atividade de água ótima é 0,99, mas multiplica-se bem em atividade de água 0,83, sendo esta característica atípica entre as bactérias patogênicas de interesse em alimentos, que normalmente não conseguem crescer em atividade de água baixa (TRABULSI; ALTERTHUM, 2016).

A maioria das cepas de *S. aureus* são tolerantes ao sal, mas sensíveis ao calor, sendo facilmente destruídas pelo processo de pasteurização ou cocção de alimentos. *S. aureus e*xpressa uma ampla variedade de fatores de virulência, sendo capaz de causar uma ampla variedade de infecções em humanos, que podem ser divididas em três categorias: 1) lesões superficiais, tais como infecção de feridas, 2) toxinoses, tais como intoxicação alimentar estafilocócica (causadas pela ingestão de enterotoxinas), 3) síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e condições sistêmicas e com risco de vida, como endocardite, osteomielite, pneumonia, abscesso cerebral, meningite e bacteremia (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

A intoxicação alimentar estafilocócica ocorre quando há ingestão de alimento contendo enterotoxinas produzidas por cepas enterotoxigênicas, sendo que uma dose inferior a 1 µg de enterotoxina é capaz de desencadear os sintomas (PINCHUK et al., 2010). Geralmente, a produção de enterotoxinas ocorre quando as contagens estão acima de 10^5 UFC/g (PICOLI et al., 2006), porém este valor é controverso, variando de acordo com os estudos. As enterotoxinas são proteínas pirogênicas classificadas como superantígenos, capazes de desencadear uma

resposta imune mais intensa que antígenos comuns, induzindo a emese e a gastroenterite (VAUGHN et al., 2020). As enterotoxinas estafilocócicas (SE) com efeito emético comprovado são SEA-SEE, SEG-SEJ, SEL-SEQ e SER-SET, que têm em comum a característica de resistir ao calor e ao pH ácido, não sendo desnaturadas pelo cozimento de alimentos contaminados, nem inativadas pelas proteases gastrointestinais (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

Alguns estudos avaliaram a presença de *S. aureus* em queijo minas artesanal, observando com frequência contagens acima do permitido pela legislação brasileira (ARAUJO, 2004; BORELLI et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2015; MARTINS et al., 2014; PERIN et al., 2017). No entanto, há poucos relatos ou notificações de surtos de toxi-infecções estafilocócicas no Brasil (BRASIL, 2018b). Contribuem para isso a subnotificação decorrente do curto período de duração da doença, falhas nas investigações epidemiológicas dos surtos, erros de diagnóstico e coleta inadequada de amostras para análise (OLIVEIRA, 2012).

Entre 2000 e 2017, foram notificados 12.660 surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, dos quais 3,24% foram relacionados com leite e derivados e 18,2% causados por *S. aureus*, sendo o terceiro microrganismo mais envolvido em surtos alimentares no país (BRASIL, 2018b). Nos Estados Unidos, onde os estudos epidemiológicos são melhores, 2,65% dos surtos ocorridos entre 1998 e 2015 foram causados por *S. aureus* (CDC, 2020c). Já na Europa, no período entre 2010 e 2014, as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) representaram o terceiro agente causal mais comum de surtos alimentares, identificadas em 49% deles. Os queijos e produtos lácteos representaram 14,4% dos produtos envolvidos (NIA et al., 2016).

1.3.3 Bactérias indicadoras de condições higiênico-sanitárias

Os coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* são microrganismos utilizados para indicar as condições sanitárias da cadeia de produção de qualquer alimento (TRMČIĆ et al., 2016).

Os coliformes totais correspondem a um grupo de bactérias Gram negativas da família Enterobacteriaceae, anaeróbias facultativas, na forma de bastonetes e capazes de fermentar a lactose com produção de gás ou ácido a 32-35ºC (TRMČIĆ et al., 2016). O grupo é formado por mais de 20 espécies, originárias do trato gastrointestinal de animais de sangue quente (*Escherichia coli*) e também bactérias

não entéricas, encontradas no solo, vegetais e água (*Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella* e *Serratia*, entre outras) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2016).

Os coliformes totais podem ser usados como indicadores de falhas de higiene durante a fabricação de alimentos, porque são facilmente inativados pelos sanitizantes. Podem também ser usados como indicadores de contaminação pós-processamento em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor (SILVA et al., 2017).

Os coliformes termotolerantes correspondem a um sub-grupo dos coliformes totais, capazes de fermentar a lactose a 44 - 45º C com produção de gás ou ácido (TRMČIĆ et al., 2016). Deste grupo faz parte *Escherichia coli*, que é um bastonete Gram negativo, anaeróbio facultativo e oxidase negativo, produtor de indol a partir do triptofano, sendo que 90% das cepas conseguem produzir β-glucuronidase (HEREDIA; GARCÍA, 2018). *E. coli* tem como habitat o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, fazendo parte da microbiota intestinal normal (FDA, 2012). Por não sobreviver bem fora do trato gastrointestinal, não é considerado um contaminante ambiental. A principal fonte de *E. coli* no leite cru e produtos lácteos é a contaminação fecal durante o processo de ordenha, juntamente com más práticas de higiene. Portanto, *E. coli* é geralmente usada como um indicador confiável de contaminação fecal direta ou indireta no leite cru e produtos lácteos crus (OMBARAK et al., 2016). Existem algumas linhagens de *E. coli* que podem causar doenças diarreicas graves em humanos, porém a maioria das cepas de *E. coli* não é patogênica (HEREDIA; GARCÍA, 2018).

1.4 Biocidas

O termo “biocida” refere-se a produtos químicos (desinfetantes e antissépticos, fungicidas, algicidas, rodenticidas e inseticidas) ou agentes biológicos (bacteriófagos e bactérias) usados para o controle de organismos patogênicos (PAUL; CHAKRABORTY; MANDAL, 2019). Os biocidas caracterizam-se por apresentar diferentes mecanismos de ação, tais como ação em membranas e parede celular microbianas, lise e coagulação de componentes intracelulares, distúrbio da homeostase celular, inibição de enzimas, transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, interação com macromoléculas, entre outros (ORTEGA-MORENTE et al., 2013).

Muitos biocidas são utilizados como sanitizantes e antissépticos, fazendo parte da formulação de muitos produtos de higiene pessoal e de limpeza de utensílios e ambiente. No caso particular de queijarias e de outras empresas fabricantes de alimentos fermentados, de pequeno e médio porte, os microorganismos provenientes do ambiente e dos manipuladores podem contaminar os produtos finais e também interferir no processo de fermentação (MARQUÉZ et al., 2017; ORTEGA-MORENTE et al., 2013), sendo necessário o seu controle. No entanto, o uso de biocidas para o controle desse microorganismos em ambientes de produção de alimentos pode resultar em aumento na prevalência e disseminação de resistência antimicrobiana na cadeia produtiva de alimentos, pois os mecanismos de tolerância a biocidas podem ser os mesmos que os de resistência a antimicrobianos de uso clínico (ORTEGA-MORENTE et al., 2013). Portanto, a investigação da tolerância dos microrganismos do ambiente e dos manipulares aos biocidas e sua possível contribuição na transmissão de resistência antimicrobiana na cadeia do alimento é de grande relevância.

Os biocidas mais importantes são os compostos catiônicos, como as biguanidas (clorexidina, por ex), e os compostos quaternários de amônio (QAC), como cloreto de benzalcônio, cetrimida, cloreto de hexadecilpiridínio e os bisfenóis (hexaclorofeno, triclosan) (ORTEGA-MORENTE et al., 2013).

Entre os biocidas, a **clorexidina** é a biguanida mais utilizada, fazendo parte da formulação de desinfetantes de superfície e outros produtos, como sabonetes antimicrobianos e curativos para feridas, em concentração que varia de 0,0025% a 4%, dependendo da finalidade (KAMPF, 2018). A clorexidina também é usada no campo veterinário como desinfetante de tetas de vacas (FERNÁNDEZ-FUENTES et al., 2014). O descarte desses produtos após o uso, principalmente em hospitais, pode atingir águas residuais, podendo ocorrer acúmulo no ambiente em concentrações sub-inibitórias (MULDER et al., 2018; ZHANG et al., 2015). A exposição contínua à clorexidina em concentrações sub-inibitórias pode resultar na seleção de microrganismos tolerantes a esse biocida, além de levar à resistência a outros tipos de estresse, como o oxidativo (FUANGTHONG et al., 2011).

O **cloreto de benzalconio** é um composto quaternário de amônia de primeira geração, usado como desinfetante de superfícies para uso doméstico e industrial e também em soluções para desinfecção de instrumentos cirúrgicos

(BUFFET-BATAILLON et al., 2012). Apresenta amplo espectro de atividade em concentrações acima de 1%, sendo bactericida e fungicida.

A **cetrimida** é um surfactante catiônico, eficaz contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e fungos (RUÍZ-LINARES et al., 2014). Alguns estudos indicam que a exposição prolongada à cetrimida em concentrações sub-inibitórias resulta na aquisição de tolerância ou resistência não apenas a esse biocida, mas a outros compostos, como fluoroquinolonas. Dentre os mecanismos responsáveis por essa ocorrência, as bombas de efluxo têm papel primordial. Algumas cepas de *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e*. coli* apresentam resistencia à cetrimida, mediada por genes em plasmídeos e associada a alterações na membrana celular (KAZEMI et al., 2012; SANTOS COSTA et al., 2015).

O **cloreto de hexadecilpiridínio** é um sal quaternário de amônio, usado como antimicrobiano e desinfetante em enxaguantes bucais, cremes dentais e sprays nasais e de garganta (HWANG et al., 2012). Trata-se de um detergente catiônico solúvel em água, clorofórmio, álcool e acetona, sendo germicida em condições ácidas e alcalinas e com amplo espectro de ação (SREENIVASAN et al., 2012; OKADA et al., 2016).

O **hexaclorofeno** é um biocida bisfenólico, usado em sabões, cremes e preparações dermatológicas. Também é usado na agricultura como acaricida e fungicida (NCBI, 2020a).

O **triclosan** é um agente antimicrobiano de amplo espectro de atividade, particularmente eficiente contra bactérias Gram positivas, principalmente *S. aureus* (FERNÁNDEZ-FUENTES et al., 2014). Trata-se de um policlorofenoxifenol, utilizado como antimicrobiano em produtos para cuidados pessoais, como sabonetes, cremes para a pele, pasta de dentes e desodorantes, e também em utensílios domésticos, como tábuas plásticas de corte, e também equipamentos esportivos e calçados (NCBI, 2020b), em concentrações que variam entre 0,1 a 2%, geralmente em combinação com outros biocidas (MCDONNELL, 2007; CAREY; MACNAMARA, 2014).

A eficiência dos biocidas depende da sua concentração e do sinergismo entre os diferentes componentes presentes nas formulações em que são utilizados (ORTEGA-MORENTE et al., 2013). Apesar dos biocidas terem uma função importante no controle das fontes potenciais de infecção, existe uma preocupação com o uso excessivo, pois pode ocorrer uma pressão seletiva em situações desfavoráveis, levando à tolerância microbiana à estes produtos (RUSSELL, 2003).

Uma população bacteriana pode apresentar tolerância a biocidas quando desenvolve uma capacidade adaptativa devido a condições de estresse. Fatores como utilização de concentrações inadequadas para a desinfecção, presença no ambiente em concentrações residuais, uso incorreto em superfícies sujas e seleção de biocidas sem atividade efetiva contra o contaminante e por um período de tempo inadequado podem contribuir para a redução da susceptibilidade a esses compostos (RUSSELL, 2003).

Determinadas cepas bacterianas podem apresentar tolerância intrínseca a biocidas, causada por: (1) falta de afinidade do biocida ao alvo bacteriano; (2) eliminação do biocida do interior da célula bacteriana por exportadores intrinsecamente ativos; (3) inacessibilidade do biocida à célula bacteriana; (4) produção de enzimas que inativam o biocida. A literatura descreve também outros mecanismos de tolerância, resultantes da ocorrência de mutações, ativação da expressão de genes silenciados ou aquisição horizontal de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (WAND, 2017).

A tolerância a alguns biocidas, como os compostos quaternários de amônio, tem sido associada à presença de genes que codificam uma família de bombas de efluxo Multi Drug Resistance (MDR), responsáveis pela eliminação dos antibióticos do interior das células bacterianas. Considerando que os genes de MDR estão localizados em plasmídeos, pode ocorrer a transferência genética horizontal desses determinantes entre microrganismos, da mesma espécie e distintos (WAND, 2017).

As bombas de efluxo são proteínas de transporte de membrana responsáveis pela eliminação de toxinas produzidas pela própria célula microbiana, sendo necessárias para manter a homeostase celular. Esta é uma das estratégias de resistência mais comuns em sistemas biológicos (LEVY, 2002; SANCHEZ; MORENO; MARTINEZ, 2005).

As bombas de efluxo podem ser específicas para um determinado composto ou para vários compostos estruturalmente distintos, incluindo diferentes classes de antibióticos (bombas de efluxo MDR) (BLAIR et al., 2015). As bombas de efluxo MDR são as mais “promíscuas”, aivas tanto contra antibióticos quanto biocidas. Deste modo, o uso indiscriminado de biocidas pode promover uma pressão seletiva, contribuindo para o surgimento de microrganismos com tolerância aos biocidas mas também com resistência cruzada entre biocidas e antibióticos (TENOVER, 2006), uma

vez que plasmídeos que possuem genes que codificam para bombas de efluxo MDR frequentemente transportam determinantes de resistência a antibióticos também (JENSEN et al., 2010; SIDHU, 2002). O envolvimento de plasmídeos facilita a transmissão horizontal destes determinantes genéticos de resistência entre cepas da mesma espécie e potencialmente de espécies distintas (TENOVER, 2006). A co-resistência a antibióticos e biocidas já foi descrita para bactérias Gram-positivas e Gram negativas (KÕLJALG; NAABER; MIKELSAAR, 2002; VALI et al., 2008).

Os sistemas de efluxo MDR são classificados em cinco famílias: **SMR** (Small Multidrug Resistance), **MATE** (Multidrug and Toxic Compound extrusion), **MSF** (Major Facilitator Superfamily) e **RND** (Resistance-Nodulation Cell Division), e **ABC** (ATP-binding cassette). As bombas RND atuam na força motriz da membrana celular, enquanto as bombas ABC hidrolisam ATP para o efluxo (DU et al., 2015). A expressão dos genes relacionados com as bombas de efluxo é controlada por fatores ambientais (DOLEJSKA et al., 2013).

A tolerância de *S. aureus* a biocidas está relacionada com bombas de efluxo MDR, principalmente das famílias SMR e MSF. As bombas de efluxo QacA e QaB da família MSF são codificadas por dois genes que se diferenciam apenas por 7 a 9 pares de bases, difíceis de distinguir por PCR, sendo por isso representados como *qacA/B*. No caso de bomba de efluxo SMR, o gene envolvido é o gene *smr-qacC/D* (WAND, 2017). Estes genes estão localizados em plasmídeos e são responsáveis pela resistência a uma ampla gama de compostos hidrofóbicos, estruturalmente diferentes (FERNÁNDEZ-FUENTES et al., 2014). Por estarem em plasmídeos, os genes podem ser perdidos se microrganismo não necessitar da ação da bomba de efluxo para sua sobrevivência. Além disso, a natureza plasmidial desses genes permite a transferência de resistência entre cepas da mesma espécie ou de espécies diferentes (BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003). Embora se saiba que as bombas de efluxo SMR e MSF (QacA e QacB) já tenham sido associadas à tolerância de algumas cepas de *S. aureus* a alguns biocidas e corantes, o conhecimento de ocorrência desta tolerância em estafilococos provenientes de animais leiteiros é limitado (TURCHI et al., 2020). Desconhece-se qualquer estudo que tenha avaliado a tolerância a biocidas em cepas de *S. aureus* provenientes de queijos artesanais brasileiros.

1.5 Diversidade microbiana nos queijos artesanais

A maioria dos estudos até o momento sobre diversidade microbiana em queijos minas artesanal empregaram técnicas dependentes de cultivo, que são trabalhosas, demoradas e frequentemente requerem complexos testes de identificação de gênero e/ou espécie, resultando na detecção de apenas uma pequena fração da comunidade microbiana presente (SANT'ANNA et al., 2019; MARTINS et al., 2018). Métodos independentes de cultivo têm maior sensibilidade que os métodos baseados em cultivo, permitindo determinar a composição da comunidade microbiana não cultivável presente (KAMIMURA et al., 2020). Os métodos que utilizam tecnologias para identificação do genoma de todos os microrganismos presentes em um determinado habitat (metagenoma), combinados com ferramentas de bioinformática, além de mais eficientes, permitem conhecer as correlações existentes entre os componentes da microbiota detectada (WOO et al., 2008).

As novas tecnologias de Next Generation Sequencing (NGS), em combinação com outros métodos de identificação de microrganismos, como a amplificação de regiões de genes conservados (16S rDNA) por PCR, permitem a obtenção rápida de uma grande quantidade de dados, altamente precisos, e estão tornando os estudos de microbiota cada vez mais acessíveis (CAPORASO et al., 2012; MALLA et al., 2019).

Em três estudos publicados recentemente, o uso da plataforma Illumina MiSeq para o sequenciamento do 16S rDNA da microbiota de queijos minas artesanal produzidos em diferentes regiões de Minas Gerais indicou a predominância de bactérias dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus,* com algumas variações de acordo com a região de produção queijeira (KAMIMURA et al., 2019; SANT'ANNA et al., 2019; KAMIMURA et al., 2020). Os estudos mencionados foram desenvolvidos com queijos minas artesanal coletados diretamente nos locais de produção, desconhecendo-se estudos que tenham avaliado a diversidade da microbiota de queijos em pontos comerciais, ou seja, locais diferentes daqueles em que são produzidos. Dessa forma, o papel das etapas pós-produção (distribuição, comercilaização, etc) na diversidade microbiana presente nos queijos que a população consome permanece desconhecido.

1.6 Desafios

O processo de fabricação do queijo minas artesanal é similar ao empregado na produção de diversos tipos famosos de queijos europeus, havendo um mercado crescente para esse tipo de queijo em todo o país. A variedade de queijos que se enquadram no conceito de “queijo minas artesanal” é muito grande, principalmente em relação ao tempo de maturação e características sensoriais e microbiológicas do produto final. Os produtores destes queijos necessitam estar alinhados com uma legislação confusa e considerada excessivamente rigorosa, não sendo de estranhar que queijos minas artesanal comercializados no país estejam em desacordo com a legislação, tanto em relação à higiene quanto aos possíveis riscos para a saúde dos consumidores. A escassez de informações sobre os queijos minas artesanal comercializados na cidade de São Paulo quanto ao atendimento dos critérios legais de higiene e segurança microbiológica, bem como quanto à diversidade microbiana encontrada nestes queijos, justificou o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho de pesquisa de mestrado pretendeu gerar dados sobre as condições higiênico-sanitárias e segurança microbiológica de queijos minas artesanal, produzidos em Minas Gerais e coletados no comércio da cidade de São Paulo, bem como contribuir com informações a respeito da diversidade bacteriana nos queijos estudados.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. nos queijos estudados, empregando-se metodologias laboratoriais fenotípicas e genotípicas;
- Avaliar as condições higiênico-sanitárias dos queijos estudados, através da contagem de coliformes totais, *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva nas amostras, empregando-se metodologias laboratoriais fenotípicas rápidas;
- Determinar a espécie dos isolados de estafilococos coagulase positiva obtidos, e avaliar sua tolerância a alguns biocidas, bem como a presença de genes de bombas de efluxo envolvidos na tolerância detectada;
- Caracterizar a diversidade bacteriana nos queijos estudados, por sequenciamento genético de nova geração, empregando a plataforma Illumina MiSeq.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

O estudo foi realizado com 100 amostras de queijos minas artesanal, coletadas em 20 pontos comerciais (PC) em diferentes regiões (RC) da cidade de São Paulo (Tabela 1). Os locais de coleta das amostras foram selecionados ao acaso. Os queijos eram de produtores diferentes ou de lotes diferentes de um mesmo produtor, localizados na Serra da Canastra (54 amostras), Araxá (13 amostras), Serro (9 amostras), Cerrado Mineiro (6 amostras), Pato de Minas (6 amostras), Salitre (3 amostras), Triangulo Mineiro (2 amostras), Campo das Vertentes (2 amostras), Alagoa (2 amostras), Coromandel (2 amostras) e Mendel Pimentel (1 amostra), no estado de Minas Gerais. Após a coleta, os queijos foram transportados ao laboratório em recipientes com gelo reciclável, e identificados de A1 a A100. Os queijos foram mantidos em refrigeração a 8º C até o momento das análises, iniciadas em 24 h após a coleta, no máximo.

Tabela 1 - Características das 100 amostras de queijos minas artesanal estudadas.

Amostra (A)	Ponto de Coleta (PC)	Região de Coleta (RC)	Produtor (PD)	Região Produtora (RP)
A1	PC1	OESTE	PD1	CERRADO MINEIRO
A2	PC1	OESTE	PD2	CANASTRA
A3	PC1	OESTE	PD3	ARAXA
A4	PC1	OESTE	PD4	SERRO
A5	PC1	OESTE	PD5	CANASTRA
A6	PC1	OESTE	PD2	CANASTRA
A7	PC1	OESTE	PD3	ARAXA
A8	PC1	OESTE	PD3	ARAXA
A9	PC1	OESTE	PD4	SERRO
A10	PC1	OESTE	PD7	TRIANGULO MINEIRO
A11	PC1	OESTE	PD5	CANASTRA
A12	PC2	OESTE	PD8	CANASTRA
A13	PC2	OESTE	PD9	SALITRE
A14	PC2	OESTE	PD10	SERRO
A15	PC2	OESTE	PD3	ARAXA
A16	PC3	OESTE	PD1	CERRADO MINEIRO
A17	PC4	OESTE	PD11	CANASTRA
A18	PC5	OESTE	PD12	CANASTRA
A19	PC5	OESTE	PD13	CANASTRA
A20	PC5	OESTE	PD14	CANASTRA
A21	PC6	SUL	PD3	ARAXA
A22	PC6	SUL	PD15	CANASTRA
A23	PC6	SUL	PD16	ARAXA
A24	PC6	SUL	PD17	CANASTRA
A25	PC7	SUDOESTE	PD18	CANASTRA
A26	PC7	SUDOESTE	PD19	CANASTRA
A27	PC7	SUDOESTE	PD20	CANASTRA
A28	PC7	SUDOESTE	PD21	CAMPO DAS VERTENTES

A29	PC7	SUDOESTE	PD22	ALAGOA
A30	PC7	SUDOESTE	PD23	SALITRE
A31	PC7	SUDOESTE	PD24	CANASTRA
A32	PC7	SUDOESTE	PD25	CERRADO MINEIRO
A33	PC7	SUDOESTE	PD10	SERRO
A34	PC7	SUDOESTE	PD26	SERRO
A35	PC8	OESTE	PD27	CANASTRA
A36	PC9	OESTE	PD20	CANASTRA
A37	PC9	OESTE	PD21	CANASTRA
A38	PC9	OESTE	PD5	CANASTRA
A39	PC9	OESTE	PD28	CANASTRA
A40	PC9	OESTE	PD29	CANASTRA
A41	PC9	OESTE	PD30	CANASTRA
A42	PC9	OESTE	PD13	CANASTRA
A43	PC9	OESTE	PD18	CANASTRA
A44	PC9	OESTE	PD31	CANASTRA
A45	PC9	OESTE	PD32	CANASTRA
A46	PC9	OESTE	PD33	CANASTRA
A47	PC9	OESTE	PD34	CANASTRA
A48	PC10	CENTRAL	PD35	CANASTRA
A49	PC11	CENTRAL	PD36	CANASTRA
A50	PC12	CENTRAL	PD37	PATO DE MINAS
A51	PC12	CENTRAL	PD38	PATO DE MINAS
A52	PC13	CENTRAL	PD5	CANASTRA
A53	PC13	CENTRAL	PD38	PATO DE MINAS
A54	PC13	CENTRAL	PD39	ARAXA
A55	PC13	CENTRAL	PD15	CANASTRA
A56	PC13	CENTRAL	PD40	ARAXA
A57	PC13	CENTRAL	PD1	CERRADO MINEIRO
A58	PC13	CENTRAL	PD16	ARAXA
A59	PC13	CENTRAL	PD41	COROMANDEL
A60	PC13	CENTRAL	PD36	CANASTRA
A61	PC13	CENTRAL	PD11	CANASTRA
A62	PC13	CENTRAL	PD42	CANASTRA
A63	PC13	CENTRAL	PD16	ARAXA
A64	PC13	CENTRAL	PD43	CANASTRA
A65	PC14	OESTE	PD44	CANASTRA
A66	PC14	OESTE	PD45	CANASTRA
A67	PC14	OESTE	PD46	CANASTRA
A68	PC14	OESTE	PD42	CANASTRA
A69	PC14	OESTE	PD44	CANASTRA
A70	PC14	OESTE	PD47	MENDEL PIMENTEL
A71	PC14	OESTE	PD51	CANASTRA
A72	PC14	OESTE	PD46	CANASTRA
A73	PC14	OESTE	PD52	CANASTRA
A74	PC14	OESTE	PD42	CANASTRA
A75	PC15	NORTE	PD42	CANASTRA
A76	PC15	NORTE	PD47	CANASTRA
A77	PC16	SUL	PD48	CANASTRA
A78	PC16	SUL	PD42	CANASTRA
A79	PC16	SUL	PD46	CANASTRA
A80	PC16	SUL	PD37	PATO DE MINAS
A81	PC16	SUL	PD41	COROMANDEL
A82	PC17	OESTE	PD50	PATO DE MINAS
A83	PC18	OESTE	PD16	CANASTRA

A84	PC18	OESTE	PD38	CERRADO MINEIRO
A85	PC18	OESTE	PD38	PATO DE MINAS
A86	PC18	OESTE	PD16	SALITRE
A87	PC18	OESTE	PD4	SERRO
A88	PC19	LESTE	PD53	CANASTRA
A89	PC19	LESTE	PD32	CANASTRA
A90	PC19	LESTE	PD7	TRIANGULO MINEIRO
A91	PC19	LESTE	PD39	ARAXA
A92	PC20	SUL	PD54	ALAGOA
A93	PC20	SUL	PD3	ARAXA
A94	PC20	SUL	PD26	SERRO
A95	PC20	SUL	PD55	CAMPO DAS VERTENTES
A96	PC20	SUL	PD56	SERRO
A97	PC20	SUL	PD56	SERRO
A98	PC20	SUL	PD25	CERRADO MINEIRO
A99	PC20	SUL	PD30	CANASTRA
A100	PC20	SUL	PD39	ARAXA

3.2 Análises microbiológicas

3.2.1 Preparo das amostras de queijo para análise

As unidades analíticas para as análises microbiológicas (25,0 ± 0,2 g) foram preparadas de acordo com a IN 62, 2003 (BRASIL, 2003). Cada unidade analítica foi constituída de duas porções de 12,5 ± 0,1 g, retiradas das partes externa e interna de cada amostra de queijo.

3.2.2 Pesquisa de Salmonella spp.

3.2.2.1 Testes fenotípicos

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. foi utilizada a metodologia ISO 6579-1 (2017). Cada unidade analítica de queijo foi homogeneizada com 225 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW), em um Smasher (BioMérieux, França), incubando-se a 37º C ± 1° C por 18 ± 2 h para o pré-enriquecimento. Os caldos de pré-enriquecimento (0,1 mL e 1,0 mL) foram transferidos para tubos contendo 10 mL de Caldo Rappaport – Vassiliadis Soja (RVS) e 10 mL de caldo Tetrationato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn), respectivamente. Os tubos com caldo RVS foram incubados a 41,5°C ± 1°C por 24 ± 3 h e os tubos com caldo MKTTn foram incubados a 37° C ± 1° C por 24 ± 3 h.

Essas culturas foram semeadas em placas de ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e de ágar Entérico de Hectoen (HE) e incubadas 37º C ± 1° C por

24 ± 3 h. As colônias típicas de *Salmonella* nestas placas foram estriadas em placas de ágar Trypticase Soja (TSA), incubadas a 37º C por 24 ± 2 h e submetidas aos testes de fermentação de carboidratos (ágar TSI - Triplo açúcar-ferro), produção de urease (ágar ureia), lisina descarboxilase (ágar LIA - Lisina-ferro), indol (caldo triptona) e β-galactosidase (fita enzimática). Os caldos RVS e MKTTn foram da Oxoid (Reino Unido) e os demais meios e a fita de teste da β-galactosidase foram da Merck (Alemanha). Os resultados foram interpretados de acordo com o protocolo do fabricante de cada meio de cultivo utilizados.

As colônias típicas de *Salmonella* nas placas de ágar XLD e HE foram também submetidas à reação de aglutinação sorológica com soro polivalente (Probac Ltda, Brasil), interpretando-se os resultados conforme as instruções do fabricante.

3.2.2.2 Testes moleculares

3.2.2.2.1 Para complementação dos resultados de *Salmonella* spp., nos testes fenotípicos

As colônias identificadas como *Salmonella* spp pelos testes fenotípicos descritos no item 3.2.2.1 foram também submetidas à testes moleculares (PCR convencional) para complementação dos resultados, empregando-se os primers descritos na Tabela 2. Como controles positivo e negativo, foram empregadas as cepas *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, respectivamente.

Tabela 2 - Primers utilizados nas PCR para pesquisa de *Salmonella* spp.

Microrganismo	Gene	Primer	Sequencia 5'-3'	Amplificado (bp)	Referência
***Salmonella* spp**	*Histidine Transport Operon*	SalG-F SalG-R	ACTGGCGTTATCCCTTTCTCTGGTG ATGTTGTCCTGCCCCTGGTAAGAGA	496	Saifullah et al. (2016)

As colônias em teste e os controles foram cultivados em caldo BHI a 37º C por 24 h, e as culturas resultantes submetidas à extração do DNA com o kit Quick-DNA™ (ZYMO Research, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. O DNA extraído foi submetido à leituras de absorbância a 260 nm e a 280 nm, em um espectrofotometro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA). A pureza do DNA extraído foi considerada adequada quando a razão entre as duas absorbâncias esteve entre 1.8 e 2.0.

Para as reações de PCR foram empregados 2 µL (50-250 ng) de DNA extraído, 1 µL de cada primer (10 pM) e 10 µL de máster mix (Promega, Brasil) e água ultrapura para PCR (Milli-Q, Millipore, EUA) suficiente para completar o volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em um termociclador (Veriti, Applied Biosystems, Cingapura), otimizadas para 3 min a 94º C para a desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94º C para desnaturação, 30 s a 60º C para anelamento e 45 s a 72º C para extensão, finalizando-se com uma extensão de 5 min a 72º C.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe (Invitrogen, EUA), em tampão TBE 0,5x (Tris Base 1M-Ácido Bórico – EDTA 0, 5M pH 8,0) com uma corrida de 30 min a 100V, empregando-se um marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Brasil). Os géis foram visualizados e fotografados sob luz UV em um transiluminador com o sistema Gel Doc XR+ (BIORAD, EUA).

3.2.2.2.2 Para pesquisa de *Salmonella* spp. por PCR em tempo real direto do caldo de pré-enriquecimento

Os caldos de pré-enriquecimento preparados para pesquisa de *Salmonella* spp pelo método ISO 6579-1 (2017) foram submetidos à extração de DNA, empregando-se o kit Quick-DNA™ (ZYMO Research, EUA) e seguindo-se as instruções do fabricante.

Para as reações de PCR em tempo real, empregou-se o kit mericon® Pathogen Detection Salmonella spp (QIAGEN, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante. As reações foram realizadas no termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Cingapura), sendo 5 min a 95º C para ativação da enzima polimerase, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95º C para desnaturação, 1 min a 60ºC para anelamento e 10 s a 72º C para extensão.

A presença de DNA de *Salmonella* spp foi detectada com base na amplificação da sequência alvo, visualizada em tempo real na plotagem gerada pelo software 7500 v2.03. A interpretação dos resultados foi feita com base nas instruções do fabricante do kit.

3.2.3 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

3.2.3.1 Testes fenotípicos

Para a pesquisa de *L. monocytogenes,* foi utilizada a metodologia ISO 11290-1 (2017). Cada unidade analítica de queijo foi homogeneizada com 225 mL de caldo Half-Fraser em um Smasher (BioMérieux, França), incubando-se a 30º C ± 1° C por 24 ± 2 h. Em seguida, 0,1 mL dos caldos Half-Fraser foram transferidos para tubos contendo 10 mL de caldo Fraser seletivo, com incubação a 37º C ± 1° C por 24 ± 2 h. Alíquotas de 0,1 mL dos caldos Half-Fraser foram semeadas por esgotamento em placas de Ágar Listeria Ottaviani & Agosti (ALOA) e de Ágar Oxford (OXA), incubando-se a 37°C por 24-48 h e 35º C por 24-48 h.

As colônias típicas de *Listeria monocytogenes* nas placas foram transferidas para placas de ágar TSA, incubadas a 37º C por 24 ± 2 h e submetidas aos testes de fermentação de xilose e ramnose e de hemólise em ágar sangue. Os resultados foram analisados de acordo com o protocolo dos fabricantes dos meios de cultivo.

O ágar OXA foi da Oxoid (Reino Unido) e os demais meios foram Merck (Alemanha).

3.2.3.2 Testes moleculares

3.2.3.2.1 Para complementação dos resultados de *L. monocytogenes* nos testes fenotípicos

As colônias identificadas como *L. monocytogenes* pelos testes fenotípicos descritos no item 3.2.3.1 foram também submetidas à testes moleculares (PCR convencional) para complementação dos resultados, empregando-se os *primers* descritos na Tabela 3. As cepas *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Tabela 3 - *Primers* utilizados na PCR para pesquisa de *L. monocytogenes*

Microrganismo	Gene	Primer	Sequência 5'-3'	Amplificado (bp)	Referência
L. monocytogenes	*PrfA*	Lip1-F Lip2-R	GTAACAGAAACATCGGTTGGC GTGTAACTTGATGCCATCAGG	274	Kureljusic et al. (2017)

As colônias em teste e os controles foram cultivados em caldo BHI a 37º C por 24 h, e as culturas resultantes submetidas à extração do DNA com o kit Quick-DNA™ (ZYMO Research, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. O DNA extraído foi submetido à leituras de absorbância a 260 nm e a 280 nm, em um espectrofotometro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA). A pureza do DNA extraído foi considerada adequada quando a razão entre as duas absorbâncias esteve entre 1.8 e 2.0.

Para as reações de PCR foram empregados 2 µL (50-250 ng) de DNA extraído, 1 µL de cada primer (10 pM) e 10 µL de máster mix (Promega, Brasil) e água ultrapura para PCR (Milli-Q, Millipore, EUA) suficiente para completar o volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em um termociclador (Veriti, Applied Biosystems, Cingapura), otimizadas para 2 min a 94º C para a desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94º C para desnaturação, 30 s a 54º C para anelamento e 45 s a 74º C para extensão, finalizando-se com uma extensão de 5 min a 74º C.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe (Invitrogen, EUA), em tampão TBE 0,5x (Tris Base 1M-Ácido Bórico – EDTA 0, 5M pH 8,0) com uma corrida de 30 min a 100V, empregando-se um marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Brasil). Os géis foram visualizados e fotografados sob luz UV em um transiluminador com o sistema Gel Doc XR+ (BIORAD, EUA).

3.2.3.2.2 Pesquisa de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real direto do caldo de pré-enriquecimento

Os caldos de pré-enriquecimento preparados para pesquisa de *Listeria monocytogenes* pelo método ISO 11290-1 (2017) foram submetidos à extração de DNA empregando-se kit Quick-DNA™ (ZYMO Research, EUA) e seguindo-se as instruções do fabricante.

Para as reações de PCR em tempo real, empregou-se o kit mericon® Pathogen Detection Salmonella spp (QIAGEN, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante. As reações foram realizadas no termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Cingapura), sendo 5 min a 95º C para ativação da enzima polimerase, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95º C para desnaturação, 1 min a 60ºC para anelamento e 10 s a 72º C para extensão.

A presença de DNA de *Listeria monocytogenes* foi detectada com base na amplificação da sequência alvo, visualizada em tempo real na plotagem gerada pelo software 7500 v2.03. A interpretação dos resultados foi feita com base nas instruções do fabricante do kit.

3.2.4 Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para a enumeração de coliformes totais e *E. coli*, cada unidade analítica de queijo foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada 0,1%, em um Smasher (BioMérieux, França). Os homogeneizados foram submetidos a diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1%, até 10^{-5}. De cada diluição foi transferido 1 mL para placas Petrifim® EC (3M, Brasil), que foram incubadas a 35º C ± 1° C por 24 ± 2 h, seguindo-se as instruções do fabricante. As colônias vermelhas e azuis com gás foram enumeradas, obtendo-se a contagem de coliformes totais. As placas Petrifim® EC foram re-incubadas por mais 24 ± 2 h a 35º C ± 1º C, enumerando-se as colônias de coloração azulada e com gás, obtendo-se a contagem de *E. coli.* Os resultados de coliformes totais e*. coli* foram expressos em UFC/g.

3.2.5 Estudos com estafilococos coagulase positiva

3.2.5.1 Enumeração dos isolados

Para a enumeração de estafilococos coagulase positiva, 1 mL de cada diluição decimal em água peptonada 0,1%, obtida conforme descrito em 3.2.4., foi transferido para placas Petrifim® STX (3M, Brasil) que foram incubadas a 37º C ± 1° C por 24 ± 2 h, seguindo-se as instruções do fabricante. As colônias de coloração vermelho-violeta, correspondentes à estafilococos coagulase positiva, foram enumeradas. Na existência de colônias atípicas, ou seja, de outra coloração, inseria-se o “Disco Revelador” na placa Petrifilm® STX, incubando-se por mais 1 a 3 h a 37º C ± 2° C.

De cada placa Petrifilm® STX, foram selecionadas cinco colônias características de estafilococos coagulase positiva e submetidas à reação de coagulase de acordo com Bennett e Lancette (2001). Com base nos resultados positivos, calculou-se as contagens de estafilococos coagulase positiva, expressando-se os resultados em UFC/g.

3.2.5.2 Identificação da espécie dos isolados de estafilococos

Cento e cinquenta e nove isolados de estafilococos coagulase positiva, obtidos das placas Petrifilm® STX, foram submetidas identificação da espécie por PCR (GANDRA et al, 2011). Os isolados foram provenientes de diferentes amostras de queijo, selecionando-se entre uma e cinco colônias por placa Petrifilm® STX. Os isolados foram cultivados em caldo BHI a 37º C por 24 h, e o DNA foi extraído com o kit Quick-DNA ™ (ZYMO Research, Estados Unidos), seguindo-se instruções do fabricante. O DNA extraído foi submetido a leituras de absorbância a 260 nm e a 280 nm, empregando-se um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA). A pureza do DNA extraído foi considerada adequada quando a razão entre as duas absorbâncias esteve entre 1.8 e 2.0. Para as reações de PCR foram utilizados os primers descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - *Primers* utilizados na PCR para identificação da espécie dos estafiolococos coagulase positiva.

Microrganismo	Gene	Primer	Sequencia 5'-3'	Amplificado (bp)	Referência
S. aureus	*Nuc*	NUC-1 NUC-2	ATGAAGTCAAATAAATCGCT TTTGGTGAAAAATACTTCTC	458	Gandra et al. (2011)
S. hyicus	*Nuc*	NUC-3 NUC-4	AAAAATAACAACAGGATTGA GTAAAGTCTGAAGCTTCTTT	270	Gandra et al. (2011)
S. intermedius	*Nuc*	NUC-5 NUC-6	GAAAAAAATTACAACAGGCG CACATCCGTTGAAGACTTTT	106	Gandra et al. (2011)

Para as reações de PCR foram empregados 2 µL (50-250 ng) de DNA extraído, 1 µL de cada primer (10pM) e 10 µL de máster mix (Promega, Brasil) e água ultrapura para PCR (Milli-Q, Millipore, EUA) suficiente para completar o volume final de 20 µl.

As reações foram realizadas em um termociclador (Veriti, Applied Biosystems, Cingapura), sendo 5 min a 94º C para a desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94ºC para desnaturação, 45 s a 55º C para anelamento e 30 s a 72º C para extensão, finalizando-se com uma extensão de 5 min a 72º C.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe (Invitrogen, EUA), em tampão TBE 0,5x (Tris Base 1M-Ácido Bórico – EDTA 0, 5M pH 8,0) com uma corrida de 40 min a 100V, empregando-se um marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Brasil). Os géis

foram visualizados e fotografados sob luz UV em um transiluminador com o sistema Gel Doc XR+ (BIORAD, EUA).

3.2.5.3 Avaliação da tolerância dos estafilococos à biocidas

Esta etapa do trabalho foi realizada no Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Espanha, sob orientação da Prof. Dra. María José Grande Burgos (Bolsa BEPE/FAPESP processo 2019/03176-9).

3.2.5.3.1 Testes fenotípicos

Os 159 isolados de estafilococos coagulase positiva, retirados das placas Petrifilm® STX, foram testados quanto à susceptibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB), cetrimida (CT), cloreto de hexadecilpiridínio (HDP), triclosan (TC), hexaclorofeno (HC) e clorexidina (CD) (Sigma Aldrich, EUA), empregando-se o método de microdiluição em caldo. Os testes foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços (Becton Dickinson, EUA), determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com Márquez et al., 2017.

Os biocidas foram dissolvidos em caldo TSB, exceto TC e HC, que foram dissolvidos em etanol a 96%. As concentrações testadas foram 256mg/ mL (1%), 128 mg/mL (0,5%), 64 mg/mL (0,25%), 32 mg/mL (0,125%), 16 mg/mL (0,0625%) 8 mg/mL (0,0312%), 4 mg/mL (0,0156%) e 2 mg/mL (0,0078%).

Para os testes, os isolados foram ativados em caldo TSB a 37° C por 24 h e as culturas foram diluídas 1:10 em caldo TSB. Cada solução de biocida foi adicionada à microplaca nas oito concentrações testadas (180 µl por poço), adicionando-se em seguida 20 µl de cada cultura diluída 1:10 a esses poços. As placas de microtitulação foram incubadas a 30° C por 24 h, efetuando-se as leituras de densidade óptica a 620 nm no espectrofotômetro leitor de microplacas Sunrise (Tecan, Áustria). Três controles foram incluídos: cultura pura (controle positivo), biocida nas concentrações analisadas sem cultura (controle negativo) e caldo de TSB sem cultura. Considerou-se como CIM a concentração do biocida imediatamente superior àquela em que a diferença entre a DO da cultura na presença do biocida e a DO do controle negativo era ≥0,05 (Marquez et al., 2017).

3.2.5.3.2 Pesquisa dos genes de bomba de efluxo *qacA/B* e *smr (qacC/D)*

Os isolados de estafilococos coagulase positiva que apresentaram tolerância aos biocidas foram submetidos à investigação da presença de genes de bomba de efluxo *qacA/B* e *smr (qacC/D*), empregando-se os primers descritos na Tabela 5 (NOGUCHI et al, 2005). O DNA desses isolados foi extraído com o kit GenElute™ (Sigma-Aldrich, Madri), seguindo-se as instruções do fabricante. O DNA extraído foi submetido a leituras de absorbância a 260 nm e a 280 nm, empregando-se um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA). A pureza do DNA extraído foi considerada adequada quando a razão entre as duas absorbâncias esteve entre 1.8 e 2.0.

Tabela 5 - Primers utilizados na PCR para pesquisa de genes de bomba de efluxo *qacA/B* e *smr (qacC/D)* em estafilococos coagulase positiva.

Gene	Primer	Sequencia 5'-3'	Amplificado (bp)	Referência
qacA/B	qacA/B-1 qacA/B-2	GCAGAAAGTGCAGAGTTCG CCAGTCCAATCATGCCTG	361	Noguchi et al. (2005)
smr (qacC/D)	smr-1 smr-2	GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT	195	Noguchi et al. (2005)

As PCR foram realizadas com 2 µL (40-100 ng) de DNA misturados com 2,5 µL (10 pM) de cada primer, 6 µL de dNTP's (200pM), 0,75 µL de $MgCl_2$ 100 nM, 5 µL de tampão Taq, 0,2 µL de Taq polimerase e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Estados Unidos) em quantidade suficiente para completar o volume final de 50 µL. As amplificações foram padronizadas com os seguintes passos: desnaturação inicial a 94º C por 2 min, desnaturação secundária a 94º C por 2 min, anelamento a 55º C por 1 min, extensão a 72º C por 1 min e extensão final de 72º C por 5 min.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% [1,2 g de agarose em 120 mL de tampão TBE diluído 1X (Tris Base 1M-0,5M EDTA pH 8,0)] por 30 min a 100 V, utilizando um marcador molecular de 100 pb (Promega, Espanha). Os géis foram visualizados após coloração com verde SYBR (Invitrogen, EUA) e fotografados sob luz UV com o sistema Gel Doc XR + (BIORAD, Estados Unidos).

3.3 Avaliação da diversidade bacteriana nos queijos estudados

3.3.1 Preparo das amostras para análise e extração de DNA

As unidades analíticas para estas análises (250 ± 0,2 mg) foram constituídas de duas porções iguais de 125 mg de cada queijo, retiradas da superfície e do interior de cada amostra.

As unidades analíticas foram submetidas à extração de DNA bacteriano empregando-se o kit E.Z.N.A® Soil DNA (Omega Bio-Tec, Georgia) com alterações baseadas em um protocolo estabelecido em outro estudo em andamento no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP (ISIDORIO, 2019), conforme segue: 1) a homogeneização das amostras utilizando-se a matriz de lise E e o homogeneizador Fastprep-24® (MP Biomedicals, Inglaterra), com potência de 5M/s por 2 x 60 s; 2) incubação à 95° C por 2 min para extração de DNA. O DNA extraído foi armazenado em freezer -20º C até ser utilizado.

3.3.2 Amplificação do 16S rDNA e preparo de biblioteca de sequenciamento

A amplificação da região V4 16S rDNA e o preparo da biblioteca de sequenciamento foram realizados de acordo com os protocolos do Earth Microbiome Project (EMP, http://www.earthmicrobiome.org/). Os primers utilizados foram sintetizados conforme indicado na Tabela 6.

Tabela 6 - *Primers* utilizados para amplificação do 16S rDNA nos queijos.

Primer	Adaptador	Barcode	Primeir pad	Linker	Sequencia
515f	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCT	‹xxxxxxxxxxx	TATGGTAATT	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'
806r	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	‹xxxxxxxxxxx	AGTCAGCCAG	CC	GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'

Para as PCR, foram empregados 5 µL (100 ng) de DNA extraído, 0,5 µL de cada primer (5 µM) e 12,5 µL de One*Taq*® Hot Start 2X Master Mix (New England Biolabs, França) e água ultrapura para PCR (Milli-Q, Millipore, EUA) suficiente para completar o volume final de 25 µL. As PCR foram realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems, Cingapura), em triplicata, nas seguintes condições: 3 min a 94º C para uma desnaturação inicial, 30 ciclos de 45 s a 94º C para desnaturação, 60 s a 50º C para anelamento e 90 s a 72º C para extensão, finalizando com uma extensão de 10 min a 72º C.

Os fragmentos obtidos nas triplicatas foram reunidos em um único volume (75 µL) e analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5x (Tris Base 1M-Ácido Bórico – EDTA 0,5M pH 8,0) por 40 minutos a 100 V para visualizar bandas de 300–350 pb, utilizando-se um padrão de peso molecular de 100 pb (Promega, Brasil). Os géis foram visualizados após coloração com SYBR Safe (Invitrogen, Brasil) e fotografados sob luz UV em transluminador e capturados com o sistema Gel Doc XR+ (BIORAD).

Em seguida, os fragmentos de DNA amplificados foram purificados com o kit Agencourt® AMPure® PCR, de acordo com as instruções do fabricante Beckman Coulter Life Sciences (EUA) e quantificados com o Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay kit (Thermo Scientific, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. A leitura foi realizada no equipamento Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (Biotek, EUA). Após a quantificação, foram utilizados 240 ng de cada amostra para construção do pool de sequenciamento. O pool de DNA foi enviado ao Laboratório de Análise e Investigação do Genoma (GENIAL-CEFAP), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (ICB/USP) para sequenciamento no sistema Illumina MiSeq, onde foi utilizado o kit de reagentes Illumina MiSeq V3 de 600 ciclos.

Os dados brutos do sequenciamento foram processados através do q2-demux plugin, para obtenção das sequências de cada amostra de queijo (HAMDAY; KNIGHT, 2009). Em seguida, as sequências foram filtradas e submetidas à remoção de ruídos do sequenciamento e identificação das sequências variantes de amplicons (“Amplicon Sequence Variants” - ASVs) através do q2-dada2 plugin (CALLAHAN et al., 2016).

Para a análise de diversidade alfa e beta, as amostras foram normalizadas utilizando o processo de rarefação (WEISS et al., 2017), resultando em uma tabela com 6245 sequências por amostra. Para a obtenção das métricas de diversidade alfa, ou seja, riqueza (número de ASVs), equitabilidade de Pielou (PIELOU, 1966), índice de diversidade de Shannon (SHANNON; WARREN WEAVER, 1949) e índice de diversidade filogenética (FAITH, 1992) utilizou-se o plugin core-metrics-phylogenetic fornecido pelos construtores do QIIME2 (https://docs.qiime2.org/2019.7/plugins/available/diversity/alpha/).

Posteriormente, a nova tabela rarefeita foi carregada no programa R, onde foram construídos os boxplots para comparações entre os valores da diversidade alfa obtidos dentre os grupos avaliados, e realizada a análise estatística entre as médias

dos grupos (Wilcoxon para 2 grupos, Kruskal-Wallis para mais de 2 grupos). As figuras foram obtidas utilizando-se os pacotes ggplot2 e ggpubr, disponíveis para R (WICKHAM, 2009; KASSAMBARA, 2018).

A classificação taxonômica das ASVs foi obtida usando-se o plugin q2-feature-classifier classify-sklearn (WERNER et al., 2012) e um classificador taxonômico fornecido pelos construtores do QIIME2 (https://docs.qiime2.org/2018.11/data-resources/). A classificação foi gerada com base no banco de dados Silva v1.32 (QUAST et al., 2013) clusterizado em 99% de similaridade e ajustado para os primers da região V4 do 16S rDNA (primers 515F-806R).

Foi construída uma árvore filogenética, que inicialmente contou com o alinhamento de todas as ASVs através do mafft (KATOH et al., 2002) (via q2-alignment) e posteriormente com a construção da árvore propriamente dita utilizando fasttree2 (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2010) (via q2-phylogeny). A árvore filogenética foi carregada no programa R para a realização das métricas de diversidade beta. Para a diversidade beta, empregou-se o pacote GUniFrac v. 1.1 (CHEN, 2018), considerando as frações unweighted UniFrac (LOZUPONE, C.; KNIGHT, 2005) e weighted UniFrac (LOZUPONE et al., 2007). A partir das matrizes de distância UniFrac foi realizada a análise das coordenadas principais (PCoA) e elaboração das figuras e gráficos de diversidade beta.

Ainda, a diversidade bacteriana encontrada nos queijos Canastra que fizeram parte deste estudo foi comparada à aquela observada em queijos Canastra obtidos nas fazendas produtoras que fizeram parte de um outro estudo realizado no mesmo laboratório (ISIDORIO, 2019). No estudo citado de Isidorio, 2019, foi observado que alguns produtores de queijos da Serra da Canastra nem sempre adotavam as Boas Práticas de Fabricação (BPF), criando-se um escore de 0 a 100, no qual os produtores que atendiam ao menor número de BPF receberam o escore 0 e aos produtores que atendiam à maior quantidade de BPF receberam o escore 100. Para a comparação entre as amostras, os queijos do estudo de Isidorio, 2019, que apresentaram escore abaixo de 25 foram excluídos, o que permitiu a comparação dos resultados de 41 amostras de queijo Canastra coletadas na Serra da Canastra e 53 amostras de queijos coletadas na cidade de São Paulo. Após construção da matriz de diversidade beta unweighted e weighted UniFrac para os dois queijos dos dois

estudos, aplicou-se o teste de permanova para verificar se havia diferenças entre a microbiota bacteriana dos queijos obtidos nos estudos.

3.3.3 Construção das figuras e análise estatística dos resultados

Para a visualização dos dados foram construídos mapas de calor (heatmaps) (KOLDE, 2019), mostrando as proporções dos principais gêneros bacterianos nos queijos de acordo com a sua procedência geográfica e local de coleta. Para essas determinações, as tabelas de ASV e de taxonomia foram carregadas no programa R e calculou-se as proporções médias de ASV, obtendo-se assim as proporções relativas dos componentes da microbiota bacteriana dos queijos. Para os heatmaps, considerou-se somente as ASVs com proporções superiores a 5%.

Para observar a dispersão da microbiota bacteriana detectada nas amostras de queijo e verificar se a dispersão foi causada pelo local de procedência e local de coleta, aplicou-se análises multivariadas permutacionais da variância (ANDERSON, 2001), utilizando-se a função adonis disponível no pacote vegan v. 2.5-4 (OKSANEN et al., 2018). As coordenadas das matrizes de distância unweighted e weighted UniFrac da microbiota bacteriana dos queijos foram extraídas através da função pcoa disponível no pacote ape (PARADIS; SCHLIEP, 2018). As duas coordenadas foram plotadas nos eixos x e y, utilizando o pacote ggplot2. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados na plataforma R v. 3.6.0 (R core team, 2019).

Para a Análise de Composição de Microbiomas foi utilizado as métricas de diversidade alfa para criar boxplots, utilizando ggplot2 e para comprovar a diferença das médias foram aplicados os testes estatísticos de análise estatística Wilcoxon (REY; NEUHÄUSER, 2011). Estas análises foram utilizadas para estudar a influência dos locais de procedência e dos locais de coleta em São Paulo na microbiota bacteriana detectada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Positividade para *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*

Das 100 amostras de queijo analisadas, a presença de *Salmonella* spp. foi evidenciada em apenas uma amostra (A39) quando foi empregada a metodologia ISO 6579-1(2017). Essa amostra também apresentou positividade para o patógeno quando analisada por PCR.

Quando os caldos de enriquecimento das 100 amostras de queijo foram analisados por PCR em tempo real para detecção de *Salmonella* spp, 8 amostras foram positivas, sendo A4 (Serro), A11 (Canastra), A39 (Canastra), A53 (Pato de Minas), A54 (Araxá), A55 (Canastra), A60 (Canastra) e A61 (Canastra), incluindo a amostra que havia sido positiva pelos métodos fenotípicos e PCR. Estas amostras estavam em desacordo com a legislação federal que estipula ausência do patógeno em 25g do alimento.

Foi observado que as amostras positivas A4 e A11, embora de diferentes produtores, haviam sido adquiridas na mesma data e mesmo estabelecimento comercial, sugerindo falhas nas Boas Práticas de Higiene e ocorrência de contaminação cruzada entre os queijos nos estabelecimentos de venda.

O mesmo foi observado para os queijos A53, A54 e A55, A60 e A61 de produtores diferentes, mas adquiridos no mesmo ponto comercial no mesmo dia. Vale ressaltar que os queijos A11, A39, A53, A54, A55, A60 e A61 positivos para *Salmonella* spp. apresentaram contagens elevadas de coliformes e de estafilococos coagulase positiva, reforçando a suspeita de falhas na higiene e nas boas praticas de manipulação em algum ponto da cadeia, da produção à comercialização.

Com resultados semelhantes aos aqui relatados, Soares (2018) também evidenciou a uma baixa positividade para *Salmonella* spp. em 40 amostras de queijo minas artesanal adquiridos no comércio de Uberlândia, MG, uma vez que apenas uma das amostras foi positiva. Em outro estudo como 84 amostras de queijo minas artesanal da região de Araxá, MG, *Salmonella* spp foi encontrada em apenas uma amostra também (SALES, 2015). Outros estudos com diferentes tipos de queijos mostraram ausência de *Salmonella* spp, como por exemplo, 161 amostras de queijos minas artesanal (meia-cura) comercializados em feiras livres de São Paulo (PEDROSA, 2010), 35 amostras de queijos de Campo das Vertentes, MG (OLIVEIRA, 2014), 40 amostras de queijos do Serro, MG (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007) e 28 amostras de queijos de Montes Claros, MG (ALMEIDA et al., 2012) e 27 amostras da

queijos da Serra da Canastra vendidos em estabelecimentos varejistas em Araras-SP (ANDRADE, 2009). Por outro lado, positividade bastante superior a observada neste estudo foi relatada por Araújo (2004), que encontrou o patógeno em 19% das amostras (7/37) e também por Pinto et al. (2016), que encontraram o patógeno em 11% dos queijos artesanais da região de Montes Claros, MG.

A baixa frequência de isolamento ou mesmo ausência de *Salmonella* spp nos queijos artesanais pode ser atribuída a vários fatores, tais como presença de uma microbiota muito diversificada, como bactérias láticas, produtoras de compostos proteicos com atividade antibacteriana (bacteriocinas) e ácidos orgânicos ao longo do processo de maturação, tornando o ambiente adverso à sobrevivência de *Salmonella* spp. (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013). A ausência de *Salmonella* spp. nos queijos pode também ser atribuída à falhas metodológicas, com uso de métodos laboratoriais com sensibilidade insuficiente para detectar baixos níveis de contaminação.

Foi possível verificar que a maioria das amostras com presença de *Salmonella* spp. (87,5%) foram também positivas para coliformes totais, *E. coli* e estafilococos (Tabela 7), sugerindo que a probalibilidade de se detectar *Salmonella* spp. é maior quando há presença destes indicadores relacionados com falhas de higiene. Tais resultados reforçam a necessidade do uso correto das ferramentas de qualidade, como Boas Práticas de Fabricação, nas fazendas produtoras e nos locais de comercialização dos queijos.

Tabela 7 - Relação entre presença de *Salmonella* spp. e contagem de indicadores de higiene

AMOSTRAS	PATÓGENO	INDICADORES DE CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITARIAS		
	***Salmonella* spp.**	***E.coli***	**Coliformes Totais**	**Estafilococos**
A4	Presença	<10	<10	<10
A11	Presença	<10	$1,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$
A39	Presença	8×10^2	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
A53	Presença	$2,3 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	<10
A54	Presença	<10	<10	$2,0 \times 10^2$
A55	Presença	85	$4,3 \times 10^2$	<10
A60	Presença	<10	<10	$2,6 \times 10^3$
A61	Presença	$4,4 \times 10^2$	$3,5 \times 10^3$	$6,5 \times 10^4$

Em relação à *Listeria monocytogenes*, o patógeno foi encontrado em três amostras de queijos (A13, A16 e A31) quando foi usado o método ISO 11290-1 (2017). Estas amostras também apresentaram positividade para o patógeno quando analisadas por PCR.

Quando os caldos de enriquecimento das 100 amostras de queijo foram analisados por PCR em tempo real para detecção de *Listeria* monocytogenes, 12 amostras foram positivas, sendo A3 (Araxá), A12 (Canastra), A13 (Salitre), A14 Serro), A16 (Cerrado Mineiro), A31 (Canastra), A43 (Canastra), A51 (Pato de Minas), A76 (Canastra), A77 (Canastra), A83 (Canastra) e A87 (Serro), incluindo as três amostras que haviam sido positivas pelos métodos fenotípicos e PCR. Estas amostras estavam em desacordo com a legislação federal que estipula ausência do patógeno em 25g do alimento.

As amostras A12, A13 e A14 haviam sido adquiridas na mesma data e local (PC2), bem como as amostras A83 e A87 (PC18), indicando falhas nas Boas Práticas de Higiene e ocorrência de contaminação cruzada entre os queijos nos estabelecimentos de venda.

A presença de *L. monocytogenes* em queijos está relacionada com a capacidade de sobrevivência e/ou multiplicação do patógeno nestes produtos e no ambiente de processamento das queijarias, que resulta na formação de biofilmes persistentes (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014). Procedimentos inadequados de limpeza e sanitização, acúmulo de soro no chão e ambiente de processamento sem ventilação que provoca condensação e umidade nas paredes e tetos são as principais causas da ocorrência de *L. monocytogenes* em uma queijaria. (COSTA DIAS et al., 2012). A falta de higiene nos locais de comercialização é outro fator que contribui para sua ocorrência.

A positividade encontrada para *L. monocytogenes* através das analises fenotípicas (3%) foi muito semelhante à relatada em outros estudos. Raimundo (2013) também encontrou o patógeno em 3% dos queijos minas artesanal analisados, provenientes de feiras livres em São Paulo. Já Ornellas (2005) encontrou o patógeno em apenas uma das 40 amostras de queijo minas artesanal da Canastra analisadas e Sales (2015) encontrou duas amostras de queijo minas artesanal de Araxá positivas para *L. monocytogenes* entre as 84 amostras estudadas. Por outro lado, vários outros autores relataram ausência de *L. monocytogenes* nos queijos estudados: Pinto et al. (2016), que analisou 18 amostras de queijos minas artesanal fabricados na região de

Montes Claros, MG; Martins et al. (2014) e Brant, Fonseca e Silva (2007) que analisaram 256 e 40 amostras de queijo minas artesanal da região do Serro, MG, respectivamente, Borelli et al. (2006) em queijos minas artesanal da região da Canastra, MG, e Velloso et al. (2003) em 248 queijos minas artesanal de Araxá, MG.

A baixa ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos pode ser explicada pela presença de bactérias láticas (COSTA et al., 2018), sabidamente capazes de produzir compostos proteicos com atividade antibacteriana (bacteriocinas) ou ácidos orgânicos (SAHRAOUI et al., 2015; ZHENG et al., 2016). Inúmeros estudos comprovaram a ação destes compostos contra *L. monocytogenes* (ALEXANDRE et al., 2002; CAMPAGNOLLO et al., 2018, CAVICCHIOLI et al., 2017; GUEDES NETO et al., 2005; ORTOLANI et al., 2010; TULINI; WINKELSTRÖTER; DE MARTINIS, 2013). As bactérias láticas nativas presentes no “pingo”, ou seja, no soro fermentado utilizado na produção de queijos minas artesanal, são necessárias para o desenvolvimento das propriedades organolépticas características destes produtos, mas também podem ser responsáveis pela inibição ou inativação de *L. monocytogenes* e outros patógenos presentes (CAMPAGNOLLO et al., 2018; NERO et al., 2008).

Sabe-se que coliformes também são importantes competidores de *L. monocytogenes*, e quando presentes em altas quantidades no queijo, podem interferir na detecção do patógeno (ARAGON-ALEGRO et al., 2006; NERO et al., 2008). Além da baixa prevalência em si, a detecção de *L. monocytogenes* pode sofrer a interferência da presença de outras espécies de *Listeria*, especialmente *L. innocua*, que têm taxa de crescimento mais rápida e podem impactar negativamente na detecção laboratorial de *L. monocytogenes* (OXARAN et al., 2017). Além disso, os métodos tradicionais de detecção do patógeno podem não ser suficientemente sensíveis para aplicação na análise microbiológica de queijos, devido *L. monocytogenes* dificilmente ser detectada quando o nível de contaminação está abaixo de 10^2 UFC/mL (MEYER-BROSETA et al., 2003).

Apesar de a incidência ser baixa quando comparada a outras doenças transmitidas por alimentos, como salmonelose ou campilobacteriose, a listeriose é considerada uma questão de saúde pública crescente devido à sua alta taxa de internação (94% nos EUA e 91,6% na Europa) e alta taxa de letalidade (entre 15% e 30% dos casos) (OXARAN et al., 2017).

Foi possível verificar que a maioria das amostras positivas para *L. monocytogenes* não apresentaram presença de coliformes, estafilococos e *E. coli* (Tabela 8), o que corrobora com autores que afirmam existir competição entre eles. Assim, através de métodos de cultivo convencionais quando esses microrganismos estiverem presente em altas quantidades a probabilidade de isolar *L. monocytogenes* se torna menor.

Tabela 8 - Relação entre presença de *L. monocytogenes* e contagem de indicadores de higiene.

AMOSTRAS	PATÓGENO	INDICADORES DE CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITARIAS		
	L. monocytogenes	***E.coli***	**Coliformes Totais**	**Estafilococos**
A3	Presença	<10	$1,1 \times 10^6$	$8,8 \times 10^4$
A12	Presença	<10	<10	<10
A13	Presença	<10	<10	<10
A14	Presença	<10	<10	<10
A16	Presença	<10	<10	<10
A31	Presença	<10	<10	<10
A43	Presença	<10	<10	<10
A51	Presença	<10	$3,0 \times 10^3$	<10
A76	Presença	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	<10
A77	Presença	<10	<10	<10
A83	Presença	<10	<10	<10
A87	Presença	<10	<10	<10

A positividade mais alta para *Salmonella* e *L. monocytogenes* nos queijos quando os patógenos foram investigados por PCR diretamente nos caldos de enriquecimento deve-se à maior sensibilidade e especificidade do método analítico quando comparado aos métodos de cultivo convencionais. De acordo com Barancelli et al. (2011), populações baixas de patógenos em um alimento, em associação com injuria subletal causada pelo processamento, além da competição com outras bactérias, dificultam sua detecção quando métodos convencionais de cultivo são empregados (ARAGON-ALEGRO et al., 2006; NERO et al., 2008).

A técnica de PCR em tempo real é mais sensível, especifica e eficiente que os métodos analíticos convencionais de cultura e também as técnicas de PCR convencionais (DESTRO, 2006; CHUANG et al., 2012; HELLBERG; MORRISSEY, 2011). Por outro lado, apresenta algumas limitações para o controle da segurança microbiológica dos alimentos, uma vez que não distingue células viáveis das células

mortas, impedindo a avaliação do potencial risco à saúde de um patógeno em um alimento (BARANCELLI et al., 2011). Uma forma de contornar este problema é incluir no método o uso de brometo de etídio monoazídico (EMA) como corante intercalante de DNA, que entra seletivamente nas membranas celulares de células mortas, mas não nas viáveis. A ativação do EMA após exposição a luz visível a 460nm promove a ligação química covalente com o DNA, impedindo a amplificação genética pela PCR. Como as células viáveis não se ligam ao corante, a amplificação do DNA ocorre normalmente (MENDONÇA et al., 2019). Vários trabalhos têm utilizado o EMA para a quantificação de microrganismos viáveis (CAWTHORH; WITTHUHN, 2008: GUY et al., 2006; LEE; LEVIN, 2008; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; MENDONÇA et al., 2019). Considerando que neste estudo não foi utilizado o EMA ou outro intercalante de DNA na pesquisa de *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* por PCR em tempo real, os resultados obtidos são apenas presuntivos, não podendo ser usados para indicação da segurança microbiológica dos queijos, que foi limitada apenas aos resultados obtidos através da metodologia de cultivo, confirmada por PCR convencional.

4.2 Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli*

Em 51% das 100 amostras analisadas, as contagens de coliformes totais estavam abaixo do limite de detecção do método (<10 UFC/g). Nas demais amostras, as contagens variaram entre 20 e 2,8 x 10^7 UFC/g, sendo acima de 10^3 UFC/g que em 24% das amostras (Tabela 9).

A legislação federal (BRASIL, 2019c) não estipula critério microbiológico para coliformes totais em queijos, porém o Decreto Estadual 44.864/2002, de Minas Gerais, determina que queijos minas artesanal só podem ser comercializados com até 3,7 log UFC/mL, ou seja, 24% das amostras estudadas estavam em desacordo com esse Decreto.

Em um estudo de caracterização do queijo minas artesanal de Montes Claros, MG, os autores observaram que 57,1% das amostras estavam em desacordo com a legislação (ALMEIDA et al., 2012). Em outro estudo com queijos de Montes Claros, MG, todas as amostras estudadas apresentaram contagens de coliformes totais superiores ao permitido pela legislação (PINTO et al., 2016). FERREIRA et al., 2011, ao analisarem queijos minas artesanal adquiridos em feiras na cidade de

Uberlândia, observaram que 70% dos queijos estavam com contagem de coliformes totais superior a permitida. Também Brant, Fonseca e Silva et al. (2007), analisando queijos artesanais do Serro, MG, encontraram coliformes totais acima de 10^3 UFC/g em 80% das amostras. Por serem contaminantes ambientais, contagens elevadas de coliformes totais indicam deficiência na qualidade higiênico sanitária durante a produção ou comercialização do queijo.

Com relação às contagens de *Escherichia coli*, observou-se que 69% amostras analisadas não apresentaram colônias típicas nas placas Petrifilm® EC, ou seja, as contagens estavam abaixo de 10 UFC/g. Nas demais amostras, as contagens de *E. coli* estiveram entre 10 e 2,5 x 10^7 UFC/g. Em 10 amostras, as contagens ultrapassaram o limite estabelecido pela IN 60/2019 da ANVISA, de 10^3 UFC/g (Tabela 9).

Tabela 9 - Contagens de coliformes totais, *E. coli* e estafilococos coagulase positiva nos queijos estudados.

AMOSTRA	INDICADORES DE CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITARIAS		
	Coliformes Totais	***E. coli***	**Estafilococos coagulase positiva**
A1	1,5 x 10^{4**}	5,7 x 10^2	<10
A2	1,7 x 10^2	<10	<10
A3	1,1 x 10^{6**}	<10	8,8 x 10^{4*}
A4	<10	<10	<10
A5	2,8 x 10^{5**}	<10	5,1 x 10^{4*}
A5	<10	<10	<10
A7	<10	<10	<10
A8	1,7 x 10^{5**}	<10	1,7 x 10^{3*}
A9	20	<10	<10
A10	<10	<10	<10
A11	1,0 x 10^2	<10	1,9 x 10^{3*}
A12	<10	<10	<10
A13	<10	<10	<10
A14	<10	<10	<10
A15	<10	<10	<10
A16	<10	<10	<10
A17	1,9 x 10^{3**}	3,2 x 10^2	5,9 x 10^{3*}
A18	1,7 x 10^2	1,3 x 10^2	<10
A19	<10	<10	6,5 x 10^{3*}
A20	<10	<10	<10

A21	<10	<10	<10
A22	<10	<10	$1,9 \times 10^{2}$
A23	<10	<10	<10
A24	<10	<10	<10
A25	<10	<10	$2,5 \times 10^{3*}$
A26	30	<10	$7,7 \times 10^{4*}$
A27	$3,1 \times 10^{2}$	20	$8,5 \times 10^{3*}$
A28	40	<10	$1,3 \times 10^{3*}$
A29	<10	<10	$1,4 \times 10^{3*}$
A30	<10	<10	<10
A31	<10	<10	<10
A32	$1,8 \times 10^{2}$	$4,6 \times 10^{2}$	<10
A33	<10	<10	<10
A34	$1,0 \times 10^{6**}$	<10	$7,6 \times 10^{3*}$
A35	<10	<10	<10
A36	$1,1 \times 10^{2}$	40	$7 \times 10^{3*}$
A37	$1,9 \times 10^{2}$	$1,6 \times 10^{2}$	<10
A38	$5,5 \times 10^{3**}$	30	<10
A39	$2,0 \times 10^{4**}$	8×10^{2}	$1,0 \times 10^{4*}$
A40	<10	<10	$5,8 \times 10^{3*}$
A41	$2,0 \times 10^{2}$	$1,5 \times 10^{2}$	$1,4 \times 10^{5*}$
A42	<10	<10	<10
A43	<10	<10	<10
A44	$1,2 \times 10^{5**}$	<10	<10
A45	<10	<10	<10
A46	$1,6 \times 10^{2}$	10	<10
A47	$7,7 \times 10^{3**}$	$3,6 \times 10^{2}$	$9,0 \times 10^{3*}$
A48	$9,4 \times 10^{5**}$	$2 \times 10^{4**}$	<10
A49	<10	<10	<10
A50	$2,6 \times 10^{2}$	80	<10
A51	$3,0 \times 10^{3**}$	<10	<10
A52	$5,2 \times 10^{5**}$	$4,4 \times 10^{5*}$	<10
A53	$2,5 \times 10^{3**}$	$2,3 \times 10^{3*}$	<10
A54	<10	<10	$2,0 \times 10^{2}$
A55	$4,3 \times 10^{2}$	85	<10
A56	$1,2 \times 10^{2}$	<10	<10
A57	40	<10	<10
A58	<10	<10	<10
A59	<10	<10	$7,0 \times 10^{2}$
A60	<10	<10	$2,6 \times 10^{3*}$
A61	$3,5 \times 10^{3**}$	$4,4 \times 10^{2}$	$6,5 \times 10^{4*}$

A62	$3,1 \times 10^{5**}$	$1,8 \times 10^{5*}$	$8,0 \times 10^{3*}$
A63	$7,4 \times 10^{2}$	$4,5 \times 10^{2}$	$1,5 \times 10^{3*}$
A64	<10	<10	<10
A65	$6,6 \times 10^{5**}$	$4,0 \times 10^{5*}$	$4,1 \times 10^{4*}$
A66	<10	<10	<10
A67	<10	<10	<10
A68	$2,8 \times 10^{7**}$	$2,5 \times 10^{7*}$	<10
A69	$1,2 \times 10^{6**}$	$1,2 \times 10^{6*}$	$4,9 \times 10^{4*}$
A70	<10	<10	<10
A71	<10	<10	$4,0 \times 10^{5*}$
A72	$1,0 \times 10^{5**}$	<10	<10
A73	$1,9 \times 10^{5**}$	$2,2 \times 10^{4*}$	$2,0 \times 10^{4*}$
A74	$9 \times 10^{4**}$	$5 \times 10^{4*}$	$1,1 \times 10^{4*}$
A75	<10	<10	<10
A76	$1,1 \times 10^{2}$	$1,1 \times 10^{2}$	<10
A77	<10	<10	<10
A78	$4,6 \times 10^{5**}$	<10	$2,7 \times 10^{4*}$
A79	<10	<10	<10
A80	<10	<10	<10
A81	$1,5 \times 10^{3**}$	$1,1 \times 10^{3*}$	<10
A82	<10	<10	<10
A83	<10	<10	<10
A84	$9,0 \times 10^{2}$	$9,0 \times 10^{2}$	<10
A85	40	<10	<10
A86	$1,5 \times 10^{2}$	40	<10
A87	<10	<10	<10
A88	$1,8 \times 10^{2}$	<10	<10
A89	<10	<10	<10
A90	$1,1 \times 10^{2}$	<10	<10
A91	<10	<10	<10
A92	<10	<10	<10
A93	<10	<10	$1,4 \times 10^{6*}$
A94	<10	<10	<10
A95	<10	<10	$3,6 \times 10^{5*}$
A96	<10	<10	$9,9 \times 10^{3*}$
A97	$8,1 \times 10^{2}$	$5,1 \times 10^{2}$	$5,8 \times 10^{3*}$
A98	<10	<10	<10
A99	<10	<10	$6,7 \times 10^{6*}$
A100	85	80	<10

*Valores acima do permitido pela legislação federal (BRASIL, 2019c).**Valores acima do permitido pelo Decreto Estadual (MINAS GERAIS, 2008).

Em outros estudos com queijos artesanais, Pinto et al. (2016), Brant, Fonseca e Silva et al. (2007), Peresi et al. (2001) e Rocha et al. (2006) encontraram *E. coli* acima do permitido pela legislação vigente à época dos estudos em 94,4%, 60% 43% e 61% das amostras estudadas, respectivamente. Esses resultados podem ser explicados pela forma artesanal de fabricação dos queijos, por queijeiros com baixa instrução tecnológica, e pela pouca qualidade insuficiente do leite cru utilizado em sua fabricação, decorrente de falhas de higiene na ordenha, conservação inadequada após a ordenha ou ocorrência de mastite no rebanho. Por outro lado, não é possível descartar a possibilidade dos queijos do presente estudo terem sido contaminados por *E. coli* no varejo, por deficiências nas boas práticas de higiene.

4.3 Estudos com estafilococos coagulase positiva

Em 65% das 100 amostras analisadas, não foram encontradas colônias típicas de estafilococos coagulase positiva nas placas Petrifim® STX, ou seja, as contagens foram <10 UFC/g. As demais amostras (35%) apresentaram contagens entre 1,9 x 10^2 e 6,7 x 10^6 UFC/g (Tabela 9).

A presença de estafilococos coagulase positiva em queijos minas artesanal é comum, conforme observado em vários outros estudos (ARAUJO, 2004; BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; MENEZES et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012). Esse fato ocorre devido às condições sanitárias inadequadas na produção, desde a obtenção do leite até o processamento do queijo, tais como a mastite nas vacas, presença do microrganismo na pele dos manipuladores e no ambiente produção do queijo e comercialização, além do armazenamento incorreto do produto final.

Em relação à legislação brasileira, que estabeleceu recentemente um limite máximo de 10^3 UFC/g para estafilococos coagulase positiva em queijos (ANVISA, 2019), 32% das amostras analisadas neste estudo estiveram em desacordo. Outros autores também encontraram contagens acima do permitido, como Brant, Fonseca e Silva (2007) e Almeida et al. (2012) que verificaram que 82,5% e 28,5% dos queijos minas artesanal de Montes Claros e da região do Serro apresentaram contagens acima de 10^3 UFC/g. Já Resende et al. (2011), ao analisarem queijos minas artesanal provenientes de feiras livres da cidade de Uberlandia, MG, encontraram que todas as amostras estudadas apresentaram contagens acima do permitido.

Quanto à identificação as espécies dos estafilococos por PCR, verificou-se que todos os 159 isolados estudados pertenceram à espécie *Staphylococcus aureus*. Sabe-se que *S. aureus* é a espécie de *Staphylococcus* mais frequente em alimentos, e também é um dos microrganismos mais comuns em vacas leiteiras, como agente causador da mastite (ARQUÉS et al., 2015). Consequentemente, *S. aureus* é frequente em leite cru representando um risco potencial para a saúde pública devido à possibilidade de produção de enterotoxinas (SOBRINHO et al., 2012).

As contagens elevadas de *S. aureus* nas amostras de queijos analisadas geram preocupação devido à possibilidade de produção de enterotoxinas estafilocócicas capazes de provocar intoxicação alimentar, que ocorre quando as contagens estão acima de 10^5 UFC/g (ARQUÉS et al., 2015). Quando os queijos são armazenados em temperatura inadequada (acima de 10^o C) pode ocorrer a multiplicação de *S. aureus*, e a produção das enterotoxinas. Outro fato preocupante é a questão das enterotoxinas serem termorresistentes, ou seja, mesmo um tratamento térmico do leite eventualmente utilizado na fabricação dos queijos não elimina o risco de ocorrência de intoxicação estafilocócica (O'BRIEN et al., 2009).

Nos testes de tolerância aos biocidas, observou-se que 60 (37,7%) dos 159 isolados de estafilococos coagulase-positivos testados foram tolerantes a pelo menos um tipo de biocida analisado. A tolerância de *Staphylococcus aureus* aos biocidas é uma realidade que vem sendo descrita (RUSSELL, 2004; VALI et al., 2008; MANIAN et al., 2014).

Os biocidas mais tolerados pelos isolados de estafilococos fazem parte do grupo dos compostos quaternários de amônio, sendo que 45 dos isolados testados (75%) foram tolerantes ao cloreto de benzalcônio (BC), certamente em decorrência da sua ampla utilização para higienização de superfícies de utensílios e instrumentos para a manipulação de alimentos (SCENIHR, 2009), e na agricultura, em formulações de pesticidas, desinfetantes e detergentes usados na criação de animais, principalmente de gado leiteiro (MULDER et al., 2018).

O segundo biocida mais tolerado foi o cloreto de hexadecilpiridínio (HDP) (14 isolados-23,3%), usado como antimicrobiano e desinfetante em enxaguatórios bucais, pílulas, cremes dentais e sprays nasais, respiratórios e na garganta (HWANG et al., 2012). A tolerância pode ser decorrente de seu uso por manipuladores dos queijos, tanto na produção como no comércio em São Paulo. Maseda et al. (2009) observaram que a exposição repetida ao HDP causa o surgimento de cepas

tolerantes, não apenas ao próprio composto, mas também a outros biocidas e antibióticos. Observou-se neste estudo que 28,6% dos isolados com tolerância ao HDP foram também tolerantes ao cloreto de benzalcônio.

A alta frequência de estafilococos tolerantes aos biocidas do grupo QAC, em particular ao BC e HDP, pode estar relacionada com a estrutura do envelope celular. Esses biocidas afetam a espessura e modificam o grau de reticulação do peptidoglicano, afetando a sensibilidade celular aos biocidas (ORTEGA-MORENTE et al., 2013).

A maioria das formulações de QAC não requer lavagem com água após a aplicação, fazendo com que o contato entre bactérias e biocidas seja prolongado, expondo-as a concentrações subinibitórias que podem favorecer a sobrevivência de clones com concentrações inibitórias mínimas (MICs) mais elevadas (BUFFET-BATAILLON, et al., 2012).

Ainda, 5 (8,3%) isolados foram tolerantes ao hexaclorofeno (HC) e 4 (6,6%) tolerantes à clorexidina (CD). A tolerância ao hexaclorofeno pode ser decorrente do aumento da rigidez da membrana celular dos isolados, impedindo que moléculas quimicamente não relacionadas entrem nas células (GADEA et al., 2016). A proteção contra o HC também pode ter ocorrido pela captação reduzida ou pela biodegradação enzimática do biocida. A tolerância ao hexaclorofeno pode também ser resultado de alterações na permeabilidade do envelope celular ou no aumento do efluxo de biocidas (SCHWEIZER, 2001).

Os resultados indicam que 80% das cepas tolerantes ao hexaclorofeno apresentaram tolerância ao cloreto de benzalcônio (BC) também. Gadea et al. (2016) demonstraram que a exposição repetida ao hexaclorofeno aumentou a tolerância a outros biocidas e antibióticos, observando que 85,2% das cepas tolerantes aos HC apresentaram tolerância ao BC e 81,5% foram tolerantes a clorexidina. De acordo com Tattawasart, Maillard, Furr e Russell (2000), o hexaclorofeno atua rompendo as membranas bacterianas, e a exposição gradual pode resultar em adaptações que facilitam a difusão de outros antimicrobianos pela membrana externa.

A clorexidina é um biocida que também causa danos nas camadas externas da parede celular e na membrana citoplasmática. O efeito bifásico na permeabilidade da membrana resulta em taxa inicial de vazamento alta, seguida por uma redução dessa taxa à medida que a concentração do biocida aumenta, devido à coagulação do citosol (GADEA et al., 2017). A exposição gradual a CD pode resultar em alterações

na permeabilidade da membrana celular, como por exemplo, alteração em sua rigidez, que por sua vez, leva a tolerância bacteriana ao biocida (GADEA et al., 2017). A tolerância a CD pode ser explicada pelo amplo uso desse biocida na medicina veterinária e assepsia humana, pelos manipuladores durante a produção e comercialização dos queijos em São Paulo.

O triclosan (TC) e a cetrimida (CT) foram os biocidas mais efetivos, visto que nenhum dos isolados testados apresentou tolerância nas concentrações testadas. O triclosan é um biocida sintético, que funciona como um antibiótico pois atua sobre a enzima FabI, que catalisa uma etapa essencial da biossíntese de ácidos graxos, principalmente em bactérias Gram positivas (WEBBER et al., 2017). Já a cetrimida afeta a integridade e organização estrutural da membrana citoplasmática bacteriana, além de outros efeitos danosos às células, como a desintegração da Força Motriz (GADEA et al., 2017), o que pode explicar sua eficiência nos estafilococos testados.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a maioria dos isolados de estafilococos coagulase positiva investigados apresentaram tolerância aos biocidas mais comumente utilizados em todo o mundo (Tabela 10). Entre os isolados tolerantes ao BC, a CIM foi 32 mg/mL para 41 isolados e 16 mg/mL para 4 isolados. Por outro lado, todos os isolados tolerantes a biocidas HDP, HC e CD apresentaram a mesma CIM, ou seja, 16 mg/mL, 16 mg/mL e 4 mg/mL, respectivamente.

Tabela 10 - Concentração mínima inibitória para biocidas e presença de genes de bombas de efluxo nos isolados de estafilococos coagulase positiva.

Isolados	**Biocidas**						**Genes de bomba de efluxo**	
	Cloreto de benzalconio (BC)	**Cetrimida (CT)**	**Cloreto de hexadecilpiridinio (HDP)**	**Triclosan (TC)**	**Hexaclorofeno (HC)**	**Clorhexidina (CD)**	***Smr***	***qacA/B***
A3C2	-	-	-	-	-	4 mg/mL	-	-
A8C5	-	-	-	-	-	4 mg/mL	-	-
A11C2	-	-	-	-	-	4 mg/mL	-	-
A22C1	32 mg/mL	-	-	-	16 mg/mL	-	+	-
A22C2	32 mg/mL	-	-	-	16 mg/mL	-	+	-
A27C2	16 mg/mL	-	-	-	16 mg/mL	-	+	+
A27C5	16 mg/mL	-	-	-	-	-	+	+
A41C1	32 mg/mL	-	-	-	16 mg/mL	-	+	+
A41C2	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	+
A41C3	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	+
A41C4	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	+
A47C2	32 mg/mL	-	16 mg/mL	-	-	-	+	+
A47C3	32 mg/mL	-	16 mg/mL	-	-	-	+	-
A47C4	32 mg/mL	-	16 mg/mL	-	-	-	+	-
A47C5	32 mg/mL	-	16 mg/mL	-	-	-	+	+
A54C1	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	+

A54C2	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	+
A59C2	-	-	16 mg/mL	-	-	-	-	+
A59C3	-	-	16 mg/mL	-	-	-	-	+
A59C4	-	-	16 mg/mL	-	-	-	-	+
A60C1	-	-	16 mg/mL	-	-	-	-	+
A60C2	-	-	16 mg/mL	-	-	-	-	+
A60C3	-	-	16 mg/mL	-	-	-	-	+
A60C4	-	-	16 mg/mL	-	-	-	-	+
A61C2	-	-	16 mg/mL	-	-	-	+	-
A61C3	-	-	16 mg/mL	-	-	-	+	-
A61C4	-	-	16 mg/mL	-	-	-	+	-
A62C1	-	-	-	-	-	4 mg/mL	-	-
A62C2	-	-	-	-	16 mg/mL	-	+	-
A65C2	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A69C3	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A69C4	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A69C5	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A71C1	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A71C2	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A71C3	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A73C4	16 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A73C5	16 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A74C2	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A74C3	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A74C4	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A74C5	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A78C1	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A78C2	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A93C4	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A93C5	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A95C1	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A95C2	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A95C3	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	+
A96C1	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A96C3	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A96C4	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A97C1	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A97C2	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A97C4	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A99C1	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A99C2	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A99C3	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A99C4	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-
A99C5	32 mg/mL	-	-	-	-	-	+	-

(-) Sem tolerância ao biocida e ausência do gene de bomba de efluxo. (+) Presença de gene de bomba de efluxo.

Os resultados para os genes de bombas de efluxo indicam que esses genes estavam presentes em 56 (93,3%) dos isolados tolerantes a biocidas testados. O gene *smr-qacC/D* foi o mais prevalente, detectado em 48 (80%) isolados, enquanto o gene *qacA/B* foi detectado em 18 (30%) isolados tolerantes a biocidas. Dez isolados apresentaram ambos os genes. Outros autores também observaram que o gene *smr-*

qacC/D é o gene de bomba de efluxo mais comum em estafilococos (TURCHI et al., 2020; BJORLAND et al., 2005).

Em relação aos isolados tolerantes ao BC, o gene *smr* estava presente em todos, sendo que 11 isolados também apresentaram o gene *qacA/B*. Com relação aos isolados tolerantes ao HC, o gene *smr* foi detectado em todos os isolados testados e o gene *qacA/B* em 2 isolados. Quanto aos isolados tolerantes ao HDP, o gene *qacA/B* foi detectado em 9 isolados, seguido pelo gene *smr,* detectado *em* 7 isolados. Apenas um dos isolados tolerantes ao HDP apresentou os dois genes simultaneamente.

Os isolados tolerantes ao CD não foram positivos para os genes *qacA/B* e *smr*, o que sugere que estes genes não desempenham papel importante na tolerância a esse biocida, devendo haver outros fatores relacionados com a tolerância (GADEA et al., 2017). É reconfortante saber que a presença de genes de tolerância à CD não teve impacto na CIM nos isolados estudados**,** tendo em vista o uso generalizado de produtos contendo CD na medicina veterinária e humana.

4.4 Não conformidades com as legislações federal e estadual

No total, 54 amostras de queijo estiveram em desacordo com as legislações federal (IN 60/2019) e estadual (Decreto 44.864/2002), sendo que 40,7% apresentaram mais de uma não conformidade. Conforme apresentado na Tabela 11, 32% das amostras estavam em desacordo devido às contagens de estafilococos coagulase positiva (*S. aureus*) acima do permitido. Ainda, 8% das amostras apresentaram não conformidade para *Salmonella* spp., 12% apresentaram não conformidade para *L. monocytogenes* e 10% das amostras apresentaram não conformidade para *E. coli.* Deste modo, apenas 46 % das amostras de queijos minas artesanal atenderam os critérios microbiológicos estabelecidos pelas legislações vigentes, evidenciando que as ferramentas de qualidade, como boas práticas, merecem mais atenção dos produtores de queijos de modo a reduzir o risco à saúde.

Tabela 11 - Amostras que apresentaram não conformidades com a legislação federal e estadual.

AMOSTRAS	PATÓGENOS		INDICADORES DE CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITARIAS		
	***Salmonella* spp.**	***L. monocytogenes***	***E.coli***	**Coliformes**	**Estafilococos**
A1				Não conforme	
A3*		Não conforme		Não conforme	Não conforme
A4	Não conforme				
A5*				Não conforme	Não conforme
A8*				Não conforme	Não conforme

A11*	Não conforme				Não conforme
A12		Não conforme			
A13		Não conforme			
A14		Não conforme			
A16		Não conforme			
A17*				Não conforme	Não conforme
A19					Não conforme
A25					Não conforme
A26					Não conforme
A27					Não conforme
A28					Não conforme
A29					Não conforme
A31		Não conforme			
A34*				Não conforme	Não conforme
A36					Não conforme
A38				Não conforme	
A39*	Não conforme			Não conforme	Não conforme
A40					Não conforme
A41					Não conforme
A43		Não conforme			
A44				Não conforme	
A47*				Não conforme	Não conforme
A48*			Não conforme	Não conforme	
A51*		Não conforme		Não conforme	
A52*			Não conforme	Não conforme	
A53*	Não conforme		Não conforme	Não conforme	
A54	Não conforme				
A55	Não conforme				
A60*	Não conforme				Não conforme
A61*	Não conforme			Não conforme	Não conforme
A62*			Não conforme	Não conforme	Não conforme
A63					Não conforme
A65*			Não conforme	Não conforme	Não conforme
A68*			Não conforme	Não conforme	
A69*			Não conforme	Não conforme	Não conforme
A71					Não conforme
A72				Não conforme	
A73*			Não conforme	Não conforme	Não conforme
A74*			Não conforme	Não conforme	Não conforme
A76		Não conforme			
A77		Não conforme			
A78*				Não conforme	Não conforme
A81*			Não conforme	Não conforme	
A83		Não conforme			
A87		Não conforme			
A93					Não conforme
A95					Não conforme
A96					Não conforme
A97					Não conforme
A99					Não conforme

* Amostras que apresentaram mais de uma não conformidade.

4.5 Diversidade bacteriana nos queijos estudados

4.5.1 Panorama geral da microbiota do queijo minas artesanal

A microbiota bacteriana encontrada nos queijos minas artesanal estudados foi composta por 25 gêneros (Figura 1), sendo *Streptococcus* (32,7%), *Lactococcus* (30,6%), *Corynebacterium* (15,6%) e *Lactobacillus* (6,8%) os gêneros de maior prevalência. Os demais gêneros encontrados foram *Brevibacterium* (2,8%), *Staphylococcus* (2,5%), *Weissella* (2,1%), *Leuconostoc* (1,9%), *Escherichia−Shigella* (0,8%), *Enterococcus* (0,7), *Alcaligenes* (0,6%), *Brachybacterium* (0,6%), *Bavariicoccus* (0,3%), *Arthrobacter*, *Serratia* e *Psychrobacter*, com 0,2% de prevalência cada um (Tabela 12). Estes resultados comprovam a grande diversidade microbiana nos queijos minas artesanal estudados.

Tabela 12 - Abundância relativa de microrganismos nos queijos minas artesanal.

Abundancia relativa	Taxonomia
32,7%	*Streptococcus*
30,6%	*Lactococcus*
15,6%	*Corynebacterium*
6,8%	*Lactobacillus*
2,5%	*Staphylococcus*
1,9%	*Leuconostoc*
2,1%	*Weissella*
0,6%	*Alcaligenes*
0,8%	*Escherichia−Shigella*
0,6%	*Brachybacterium*
0,3%	*Bavariicoccus*
0,2%	*Arthrobacter*
0,2%	*Serratia*
0,2%	*Psychrobacter*

Outros autores encontraram resultados similares. Kamimura et al. (2020), analisando queijos minas artesanal da região da Serra da Canastra por sequenciamento do 16S rDNA com Illumina MiSeq, encontraram *Streptococcus e Lactococcus* com maior abundancia relativ*a.* Em outro estudo de Kamimura et al. (2019), realizado com queijos minas artesanal de 5 regiões de Minas Gerais (Araxá,

Canastra, Campo das Vertentes, Cerrado e Serro), o sequenciamento do 16S rDNA com Illumina MiSeq indicou a predominancia dos *Streptococcus* e *Lactococcus*. SANT'ANNA et al. (2019), analisando queijos minas artesanal da Serra do Salitre pela mesma metodologia de sequenciamento (16S rDNA com Illumina MiSeq), Perin et al. (2017) empregaram rep-PCR e LH-PCR para caracterizar a microbiota de queijo artesanal originário das regiões do Serro, Canastra, Serra do Salitre, Araxá e Campo das Vertentes, encontrando os gêneros *Lactococcus e Lactobacillus* como predominantes na microbiota desses queijos. Empregando a técnica de DGGE, Arcuri et al. (2013) encontraram *Streptococcus salivarius, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* como bactérias predominantes nos queijos artesanais mineiros coletados no Serro, Cerrado, Serra da Canastra *e* Araxá. Lacerda et al. (2011), através de sequenciação pelo método de Sanger, também reportaram que *L. lactis* e *S. salivarius* eram as espécies prevalentes em queijos da região da Serra da Canastra.

A prevalência dos *Streptococcus e Lactococcus* nos queijos minas artesanal pode ser explicada pelas estratégias de adaptação desses microrganismos em queijos feitos a partir de leite cru, seja naqueles maturados por menos de 1 mês, como os queijos da Serra da Canastra, como naqueles maturados por longos períodos como Grana Padano, que podem maturar por até 23 meses (KAMIMURA et al., 2020). Alguns autores indicam que a cultura inicial ("pingo") parece ser a fonte de *Streptococcus* e *Lactococcus* nos queijos minas artesanal, tornando-o o principal responsável pela formação da microbiota característica dos queijos maturados em Minas Gerais (KAMIMURA et al., 2020; SANT'ANNA et al., 2019).

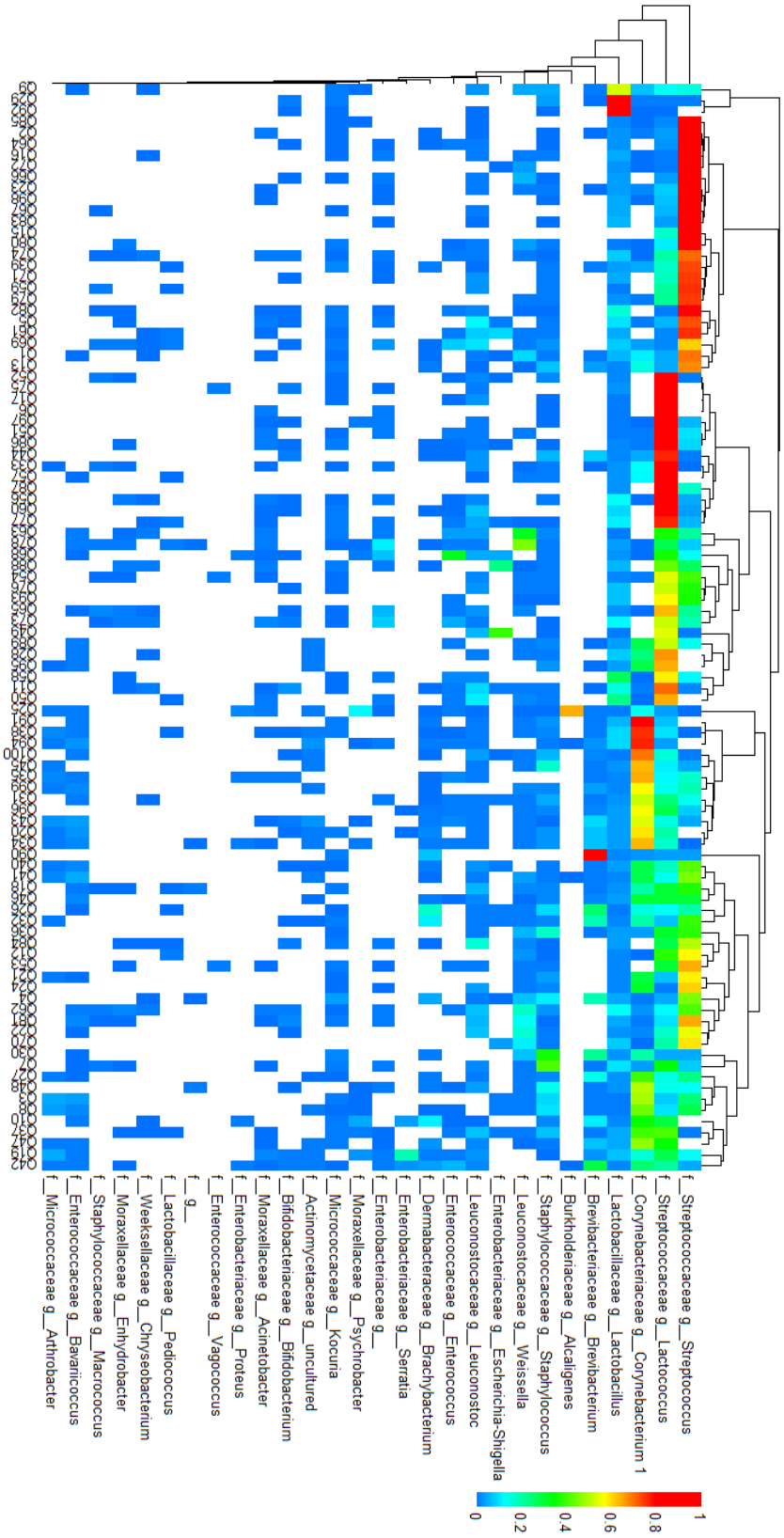

Figura 1. Mapa de calor mostrando os principais gêneros que compõe a microbiota do queijo minas artesanal. Cada coluna refere-se à uma amostra e cada linha um gênero bacteriano. Os gêneros mostrados são aqueles em que a soma de suas proporções em todas as amostras é maior que 5%. As linhas e as colunas foram agrupadas utilizando o método Ward.D2.

Bactérias do gênero *Corynebacterium,* encontradas nas amostras estudadas, não foram relatadas em estudos anteriores sobre diversidade microbiana em queijos minas artesanal. No entanto, Kamimura et al. (2020) reportaram que esse gênero estava presente em amostras do ambiente de processamento das fazendas (prateleiras de maturação) produtoras de queijos Canastra. Sabe-se que ingredientes, instalações de processamento e culturas iniciais abrigam microbiota indígena que influenciam as características quimio-sensoriais dos queijos (CUFFIA et al., 2018; DEETAE et al., 2007; MONTEL et al., 2014; SÁDECKÁ et al., 2016) e que prateleiras de madeira para maturação podem ser uma fonte de microrganismos que se transferem para a superfície dos queijos (KAMIMURA et al., 2020). Portanto, é possivel que a fonte de *Corynebacterium* tenha sido o ambiente de fabricação dos queijos, por falhas nas Boas Práticas de Fabricação.

Staphylococcus, Escherichia−Shigella e *Psychrobacter* são contaminantes ambientais e não devem estar presentes nos queijos. A presença desses microrganismos nos queijos estudados pode estar relacionada com precariedade nas condições de higiene na obtenção e armazenamento do leite e com falhas nas etapas de processamento, além da contaminação ambiental. Outros autores também encontraram estes microrganismos nos queijos minas artesanal (KAMIMURA et al., 2019; KAMIMURA et al., 2020; SANT'ANNA et al., 2019). Outros microrganismos indesejáveis na microbiota de queijos são *Arthrobacter*, *Serratia, Enterococcus* e *Alcaligenes.*

4.5.2 Co-variáveis analisadas que podem influenciar a microbiota bacteriana dos queijos artesanais

A Tabela 13 mostra os resultados da Análise Permutacional Multivariada da Variância (adônis) (ANDERSON, 2001) para determinação da relação entre as regiões produtoras (RP), pontos de coleta (PC) e regiões de coleta (RC) dos queijos em São Paulo e a microbiota bacteriana detectada nas amostras de queijos estudadas. Observou-se que as regiões de coleta e os pontos de coleta em São Paulo apresentam maior influência sobre a microbiota detectada do que as regiões de produção ($p<0,05$). Tais resultados podem ser decorrentes de alterações na microbiota durante o transporte do queijo da região de produção até o ponto de coleta em São Paulo, diferenças no armazenamento durante o transporte nos pontos de

coleta e diferenças nas práticas de higiene nos diferentes pontos de venda (pontos de coleta).

Tabela 13 - Análise Permutacional Multivariada da Variância para a diversidade bacteriana nos queijos minas artesanal estudados

Variável	Unweighted UniFrac		Weighted UniFrac	
	R^2	Valor p	R^2	Valor p
RP	0.10394	0.055	0.05141	0.828
PC	0.28059	0.001	0.48572	0.001
RC	0.08823	0.004	0.16268	0.003

4.5.3 Comparação da diversidade bacteriana dos queijos Canastra coletados no comércio em São Paulo e queijos Canastra coletados nas fazendas produtoras em Minas Gerais.

Conforme indicado na Tabela 14, não foi encontrado diferença significativa entre os queijos Canastras coletados no comercio de São Paulo e queijos Canastras coletados diretamente das fazendas. Assim, os gêneros bacterianos mais abundantes nos queijos Canastra coletados em São Paulo (*Lactococcus e Streptococcus*) foram os mesmos encontrados nos queijos Canastra coletados nos locais de produção (ISIDORIO, 2019).

Tabela 14 - Análise Permutacional Multivariada da Variância para a comparação da microbiota bacteriana encontrada em queijos Canastra coletados nas regiões produtoras (ISIDORIO, 2019) e nos queijos Canastra adquiridos no comércio de São Paulo.

Matriz	R^2	Valor p
Unweighted UniFrac	0.01809857	0.176
Weighted UniFrac	0.01604387	0.148

A prevalência dos gêneros *Lactococcus e Streptococcus* está de acordo com o reportado por Kamimura et al. 2020, que sugerem que esses dois gêneros têm vantagens competitivas em relação a outros gêneros bacterianos. Além disto, estes resultados apontam a microbiota preponderante dos queijos Canastra, ajudando na obtenção de uma “assinatura microbiana” desses queijos. Além de apoiar a obtenção de certificações de qualidade, a “assinatura microbiana” pode auxiliar os produtores artesanais a padronizar o processo de produção e facilitar a venda dos queijos minas artesanal por via interestadual e internacional.

5 CONCLUSÕES

1. Apenas 46% das amostras estavam em acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pelas legislações federal e estadual vigentes.
2. A maioria das cepas de *S. aureus* isoladas dos queijos estudados apresentou tolerancia aos biocidas testados, sendo triclosan e cetrimida os biocidas mais ativos.
3. Na pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, as técnicas de cultivo foram menos sensíveis e eficientes que a análise molecular por PCR.
4. Na diversidade bacteriana encontrada nos queijos analisados, as espécies de maior prevalência foram *Streptococcus* spp. e *Lactococcus* spp.
5. A microbiota bacteriana encontrada nos queijos da Serra da Canastra adquiridos no comérico de São Paulo não diferiu significativamente daquela encontrada nos queijos da Serra da Canastra coletados diretamente nos locais de produção (ISIDORIO, 2019).

6 REFERÊNCIAS*

ALEXANDRE, D. P. et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from artisanal Minas cheese against indicator microorganisms. Braz. J. Vet. Res. An. Sci., v. 54, p. 424-428, 2002.
ALMEIDA, A. C. et al. Characterization of production of artisanal cheese in the region of Montes Claros-MG, Brazil. Acta Vet. Bras., v.6, n.4, p.312-320, 2012.

ALMEIDA, R. Surtos por *Salmonella*: dados estatísticos, sintomas e prevenção. Food Safety Brazil, 2015. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/surtos-porsalmonella-dados-estatisticos-sintomas-e-prevencoes/>. Acesso em: 12 jun. 2020.

ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecology, v. 26, n. 1, p. 32–46, 2001.

APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORATO, J. A. A. Evaluation of the microbiological quality of Minas Cheese produced by dairies in the state of Minas Gerais. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

ARAGON-ALEGRO, L. C. et al. Influência de coliformes na população de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas frescal. In: Congresso Brasileiro de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 10, Curitiba. Anais. Campinas: SBCTA, 2006.

ARAUJO, R. A. B. M. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas Artesanal da região de Araxá. 2004. 148f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

ARAUJO, R.A.B.M. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas Artesanal da região de Araxá. 2004. 148f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

ARCURI, E. F. et al. Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR–DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. J. Food Control., v. 30, p. 1-6, 2013.

ARQUÉS, J. L. et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. Biomed Res. Int., v. 2015, p. 1-9, 2015.

BARANCELLI, G. V. et al. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde. 2011. Arq. Inst. Biol., v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.

BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: Food and Drug Administratrion (FDA). Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. 8th ed. rev. Silver Spring: FDA, cap. 12.

BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheese microbiology. J. Dairy Sci., v. 11, n. 4, p. 259–274, 2001.

BJORLAND, J. et al. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. J. Clin. Microbiol., v. 43, p. 4363-4368, 2005.

BLAIR, J. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat. Rev. Microbiol., v. 13, p. 42-51, 2015.

BORELLI, B. M. et al. *Enterotoxigenic Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra Cheese, Brazil. Braz. J. Microbiol., v. 37, p. 545-550, 2006.

BRANT, L. M. F.; Fonseca, L. M.; Silva, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 59, n. 6, p.1570-1574, 2007.

---

* Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas-NBR6023/2002.

BRASIL, Lei Complementar nº 95, de 26 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre a elaboração, a alteração e a consolidação das leis, conforme determina o parágrafo único do art. 59 da Constituição Federal, e estabelece normas para a consolidação dos atos normativos que menciona. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 1998. < http://www2.camara.leg.br>. Acesso em: 05 jul. 2020

BRASIL. Decreto Federal Nº 1.255, de 25 de junho de 1962. Altera o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária do Produto de Origem Animal, aprovado pelo Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, 1962. Disponível em: http://www.planalto.gov.br. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Decreto Federal Nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Diário Oficial União, Seção1, página 2, 2018a. Disponível em: < http://www2.camara.leg.br>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Decreto Federal Nº 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamenta a Lei Nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial União, Seção1, página 10785, 1952. Disponível em: < http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1950-1959/decreto-30691-29-marco-1952-339586-norma-pe.html>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Decreto Federal Nº 5.741, de 30 de março de 2006. Regulamenta os arts. 27-A, 28-A e 29-A da Lei Nº 8.171, de 17 de janeiro de 1991, organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, e dá outras providências, 2006. Disponível em: http://www.planalto.gov.br. Acesso em: 09 jul. 2020.

BRASIL. Decreto Federal Nº 7.216, de 17 junho de 2010. Dá nova redação e acresce dispositivos ao Regulamento dos arts. 27-A, 28-A e 29-A da Lei nº 8.171, de 17 de janeiro de 1991, aprovado pelo Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, e dá outras providências. Diário Oficial União, Seção1, página 2, 2010a. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Decreto Federal Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei Nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei Nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial União, Seção1, página 3, 2017. Disponível em: < http://www2.camara.leg.br>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Decreto Federal Nº 9.918, de 18 de julho de 2019. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal, 2019b. Disponível em: http://www.planalto.gov.br. Acesso em: 05 jul. 2020.

BRASIL. Lei Federal Nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Diário Oficial União, Seção1, página 18161, 1950. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L1283.htm>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Lei Federal Nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências, 2019a. Disponível em: < planalto.gov.br>. Acesso em: 05 jul. 2020.

BRASIL. Lei Federal Nº 7.889, de 23 de novembro de 1989. Dispõe sobre inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal, e dá outras providências. Diário Oficial União, Seção1, página 21529, 1989. Disponível em: < http://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1989/lei-7889-23-novembro-1989-372914-normaatualizada-pl.html>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n° 57 de 15 de dezembro de 2011. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, página 23, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n° 146 de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos, 1996. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 28 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n° 100 de 17 de março de 2010. Reconhece a equivalência dos serviços de inspeção de produtos de origem animal do Estado de Minas Gerais, 2010b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Resolução nº 07, de 28 de novembro de 2000. Define Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para Seu Relacionamento Junto ao Serviço de Inspeção Federal, 2000. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013. Diário Oficial da União. Brasília, Seção 1, página 19, 2013. Disponível em: < http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de agosto de 2003. Seção 1. Disponível em: < https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-62-de-26-08-2003,665.html>. Acesso em: 10 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Surtos Transmitidos por Alimentos no Brasil, 2018b. Disponível em: < https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf >. Acesso em: 10 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa n°60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de dezembro de 2019. Edição 249. Seção 1. Página 133, 2019c. Disponível em: <http://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 10 jan. 2020.

BRUMANO, E. C. DA C. Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária na Região do Serro – MG. 2016. Tese de doutorado.136f. Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

BUCHANAN, R.L. et al. Whiting A review of Listeria monocytogenes: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. J. Food Control., v. 75, p. 1-13, 2017.

BUFFET-BATAILLON, S. et al. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds a critical review. J. Antimicrob. Agents. V. 39, n. 5, p. 381-389, 2012.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux- mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. J. Antimicrob. Agents, v. 22, p. 205-210, 2003.

BUTTON, J. E.; DUTTON, R. J. Cheese microbes. Current Biol., v. 22, n. 15, p. 587-589, 2012.

CALLAHAN, B. J. et al. Holmes. Dada2: High resolution sample inference from light amine data. Nature methods , v. 13 (7), p. 581, 2016.

CALLON, C.; MILLET, L.; MONTEL, M. C. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. J. Dairy Sci., v. 71, n. 2, p. 231-244, 2004.

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. Food Microbiol., v. 73, p. 288-297, 2018.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. J. ISME, v. 6, p. 1621-1624, 2012.

CAREY, D. E.; MACNAMARA, P. J. The impact of triclosan on the spread of antibiotic resistance in the environment. Front. Microbiol., v. 5 p. 780, 2014.

CASTRO, R. D. et al. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during dry and rainy seasons J. Dairy Sci., v. 99, p. 1-11, 2016.

CAVICCHIOLI, V. Q. et al. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. J. Dairy Sci., v. 100, p. 2526-2535, 2017.

CAWTHORN, D. M.; WITTHUHN, R. C. Selective PCR detection of viable Enterobacter sakazakii cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. J. Appl. Microbiol., v. 105, p. 1178-1185, 2008.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Listeria, 2020b. Disponível em: https://www.cdc.gov/listeria/index.html> Acesso em: 01 fev. 2020.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Salmonella, 2020a. Disponível em: https://www.cdc.gov/salmonella/> Acesso em: 01 fev. 2020.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Sthapylococcus aureus, 2020c. Disponível em :< https://www.cdc.gov> cited: 01 fev. 2020.

CHEN, J. GUniFrac: Generalized UniFrac Distances. . [S.l: s.n.]. , 2018.

CHUANG, P. S. et al. Identification of tuna species by a real-time polymerase chain reaction technique. Food Chem., v. 133, p. 1055-1061, 2012.

COSTA DIAS, M. A. et al. On the implementation of good manufacturing practices in a small processing unity of Mozzarella cheese in Brazil. Food Control., v. 24, n. 1, p. 199-205, 2012.

COSTA, W. K. A. et al. Exploiting antagonistic activity of fruit-derived Lactobacillus to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. 2018. Food Res. Int.**,** v. 108, p. 172-182, 2018.

CUFFIA, F. et al. Characterization of volatile compounds produced by *Lactobacillus helveticus* strains in a hard cheese. Food Sci. Technol., v. 24, p. 67-77, 2018.

DEETAE, P. et al. Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. Appl. Microbiol. Biotechnol., v76, p. 1161-171, 2007.

DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final. 2006. 74f. Tese (Livre Docência). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DOLEJSKA, M. et al. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance nodulation cell division/multidrug efflux pump. J. Antimicrob. Chemoth., v. 68, p. 34-39, 2013.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarante microbiological safety of brasilian artisan canastra cheese. Food Sci. Technol., v. 33, n. 1. p. 180-185, 2013.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarante microbiological safety of brasilian artisan canastra cheese. Food Sci. Technol, v.33, n.1. p.180-185, 2013.

DOS SANTOS, C. G. et al. Hygienie sanitary conditions in production of artesanal cheese made in Uberaba – MG. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, v. 72, n. 2, p. 96-107, abr/jun. 2017.

DU, D. et al. Luisi Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters Curr. Opin. Struct. Biol., v. 33 p. 76-91, 2015.

EFSA. European Food Safety Authority. Listeria, 2020b. Disponível em: < https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria> Acesso em: 01 fev. 2020.

EFSA. European Food Safety Authority. Salmonella, 2020a. Disponível em: < https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella> Acesso em: 01 fev. 2020.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Queijo Minas Artesanal do Serro tem Indicação Geográfica reconhecida, 2011. Disponível em: < http://www.emater.mg.gov.br>. Acesso em: 12 jun. 2020.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Mais um município aguarda o registro de indicação geográfica de procedência na região produtora do queijo minas artesanal da canastra, 2016. Disponível em: < http://www.emater.mg.gov.br>. Acesso em: 12 jun. 2020.

FDA. Food and Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook “Bad Bug Book”. 2ed. 2012. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition>. Acesso em: 12 jun. 2020.

FERNÁNDEZ-FUENTES, M. A., et al. Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. J. Food Microbiol., v. 172 p. 49–56, 2014.

FERREIRA, R. M. et al. Quantificação de coliformes fecais e termotolerantes em queijo Minas frescal artesanal. 2011. Pubvet., v. 5, n. 5, p. 1019-1026, 2011.

FIGUEIREDO, S. P. et al. Características do leite cru e do queijo minas artesanal do Serro em diferentes meses. Arch. Vet. Sci. v. 20, n. 1, p. 68-82, 2015.

FILIPPIS, F. et al. A selected core microbiome drives the early stages of three popular italian cheese manufactures. PLOS One, v. 9, n. 2, 2014.

FUANGTHONG, M. et al. Exposure of Acinetobacter baylyi ADP1 to the biocide chlorhexidine leads to acquired resistance to the biocide itself and to oxidants. J. Antimicrob. Chemoth., v. 66, p. 319-322, 2011.

GADEA, R. et al. Adaptation to Biocides Cetrimide and Chlorhexidine in Bacteria from Organic Foods: Association with Tolerance to Other Antimicrobials and Physical Stresses. J. Agric. Food Chem., v. 65, p. 1758-1770, 2017.

GADEA, R. et al. Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses Food Res., v. 85, p. 131-143, 2016.
GANDRA, E.A., et al. Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus*. Ciencia e Tecnol. Aliment., v. 31, p. 946-949, 2011.

GARCIA, E. F. et al. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp, processing of by-products and potential probiotic properties of selected strains of *Lactobacillus*. Front. Microbiol., v. 30, p. 7-1371, 2016.

GHOSH, T. et al. Mechanistic Insights Into Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Associated With Ethnic Fermented Dairy Products. Front. Microbiol. v.10, p. 502, 2019.

GOMAND, F. et al. Food Matrix Design for Effective Lactic Acid Bacteria Delivery. Annual Review of Food Science and Technology, v. 10:1, p. 285-310, 2019.

GONZALES-BARRON et al. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence or not of intentionally-added lactic acid bacteria during ripening of artisanal Minas semi-hard cheese. J. Food Microbiol., v. 91, 103545, 2020.

GUEDES NETO, L. G. et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal and industrial “coalho” cheese against indicator microorganisms. Braz. J. Vet. Res. An. Sci**.,** v. 57, p. 245-250, 2005.

GUY, R. A. et al. A rapid molecular-based assay for direct quantification of viable bacteria in slaughterhouses. J. Food Prot., v. 69, p. 1265-1272, 2006.

HAMDAY, M.; KNIGHT, R. Microbial community profiling for human microbiome projects: tools, techniques, and challenges. Genome Research, v. 19, p. 1141-1152, 2009.

HELLBERG, R. S.; MORRISEY, M. T. Advances in DNA-Based Techniques for the Detection of Sea food Species Substitution on the Commercial Market. J. Lab. Autom., v.16, p. 308-321, 2011.

HENNEKINNE, J. A. et al. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks be Characterized?. Toxins, v. 2, p. 2106-2116, 2010.

HEREDIA, N; GARCIA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: a review Anim. Nutr., v. 4, p. 250-255, 2018.

HWANG, Y. Y., et al. Antimicrobial activity of nanoemulsion in combination with cetylpyridinium chloride in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemoth., v. 57, p. 3568-3575, 2012.

IMA. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. Estabelece diretrizes para a produção do queijo minas artesanal, 2013. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/>. Acesso em: 17 jul. 2020.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. 2014. Modo artesanal de fazer queijo minas: Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre (alto Paranaíba) Dossiê IPHAN 11. http:// http://portal.iphan.gov.br//uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minas_web.pdf. Acess on 2019 Feb 07.

ISIDORIO, W. R. Caracterização da microbiota de queijos artesanais provenientes da Serra da Canastra - MG e da cultura iniciadora natural utilizada em sua produção. 2019. 79p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

ISO 11290-1. Microbiological examination of the food chain – Horizontal method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method. The International Organization for Standardization, 2017.

ISO 6579-1. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp. 1th ed. The International Organization for Standardization, 2017.

JENSEN, S. O. et al. Analysis of the prototypical *Staphylococcus aureus* multiresistance plasmid pSK1. Plasmid. V. 64, p. 135-142, 2010.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B. et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo Mozzarella cheese**.** Probiotics Antimicrob. Proteins**,** v. 6, p. 141–156, 2014.

KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. J. Food Microbiol., v. 80, p. 40–49, 2019.

KAMIMURA, B. A. et al. Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. J. Food Microbiol., v. 89, 103453, 2020.

KAMPF, G. Adaptive bacterial response to low level chlorhexidine exposure and its implications for hand hygiene. Microbial Cell. V. 6, n. 7, p. 307-320

KASSAMBARA, A. ggcorrplot: Visualization of a Correlation Matrix using “ggplot2”. . [S.l: s.n.]. Disponível em:< https://cran.r-project.org/web/packages/ggcorrplot/index.html >, 2018.

KATOH, K. et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res., v. 30, n. 14, p. 3059–66, 2002.

KAZEMI, M. et al. Kermanshahi, R.K., Dehkordi, E.H., Payami, F. and Behjati, M. 2012. Resistance index of penicillin-resistant bacteria to various physicochemical agents. ISRN Microbiol., v. 2012, 2012: ID 789474.

KOLDE, R. pheatmap: Pretty Heatmaps. [S.l:s.n.]. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>, 2019.

KÕLJALG, S.; NAABER, P; MIKELSAAR, M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. J. Hosp. Infect., v. 51, p. 106-113, 2002.

KURELJUŠIĆ, N., et al. Isolation and detection of Listeria monocytogenes in poultry meat by standard culture methods and PCR. IOP levy Conf. Series: Environ. Earth Sci., v. 85. 012069, 2017.

LACERDA, I. C. A. et al. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and Minas cheese production using culture independente 16S rRNA gene sequence analysis. Braz. J. Microbiol., v. 42, p. 650-657, 2011.

LEE, J. L.; LEVIN, R. E. Discrimination of c-irradiated and non irradiated Vibrio vulnificus by using real-time polymerase chain reaction. J. Appl. Microbiol., v. 104 p. 728-734, 2008.

LOZUPONE, C. A. et al. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. Appl. Environ. Microbiol., v. 73(5), p. 1576-1585, 2007.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. Appl. Environ. Microbiol., v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

MALLA, M. A., et al. Exploring the human microbiome: the potential future role of next-generation sequencing in disease diagnosis and treatment. *Front. Immunol*. 2019.

MÁRQUEZ, F. M. L. et al. Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. J. Food Microbiol., v. 62, p. 77-81, 2017.

MARTINS, J. M. et al. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. Braz. J. Microbiol. v. 46, ed.1, p. 219-230, 2014.

MARTINS, M. C de F. et al. Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. Food Res., v. 108, p. 295-300, 2018.

MASEDA, H., et al. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. J. Antimicrob. Chemoth., v. 53, p. 5230-5235, 2009.

MATA, G. M. S. C. Comparação de métodos para pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. e avaliação microbiológica e físico química em queijos minas artesanal. 2009. Dissertação de mestrado. 89f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

MCDONNELL G. E. Chapter 3 Chemical Disinfection, p. 79-148. Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action, and resistance, 1st ed. ASM Press, Washington, DC., USA, 2007.

MENDONÇA, J. F. M. et al. Detection of Viable *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in Coalho Cheese by Real-Time PCR. Food Sci. Technol., v. 39 p. 690-696, 2019.

MENEZES, L. D. M., et al. Avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal produzido em Minas Gerais em 2008. In: Anais XVI Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, 19-23 jul. 2009. Belo Horizonte, MG, 2009.

MEYER-BROSETA, S. et al. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. J. Food Microbiol., v. 80, n. 1, p. 1-15, 2003.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. Altera o regulamento da lei n° 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008. Disponível em: < https://www.almg.gov.br>. Acesso em: 15 de jul. 2020.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002. Disponível em:<http://www.almg.gov.br/>. Acesso em: 01 jul. 2020.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2012. Disponível em: < https://www.almg.gov.br>. Acesso em: 15 jul. 2020.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 22.920 de 12 de janeiro de 2018. Altera a Lei nº 19.476, de 11 de janeiro de 2011, que dispõe sobre a habilitação sanitária de estabelecimento agroindustrial rural de pequeno porte no Estado e dá outras providências, 2018a. Disponível em: < https://www.almg.gov.br>. Acesso em: 15 jul. 2020.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 23.157 de 18 de dezembro de 2018. *Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais,* 2018b. Disponível em: < https://www.almg.gov.br>. Acesso em: 15 jul. 2020.

MONTEL, M. C. et al. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. J. Food Microbiol., v. 177, p. 136-154, 2014.

MULDER, I. et al. Quaternary ammonium compounds in soil: Implications for antibiotic resistance development. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, v. 17, p. 159-185, 2018.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Hexachlorophene, CID=3598. 2020a. Disponível em < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexachlorophene> Acesso em 12 jul. 2020.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Triclosan, CID=5564. 2020b. Disponível em < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5564> Acesso em: 12 jul. 2020.

NERO, L. A. et al., Listeria monocytogenes and *Salmonella* spp. In raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. ZoonosesPublic Hlth., v. 55 p. 299-305, 2008.

NIA, Y. et al. Review Over a 3-Year Period of European Union Proficiency Tests for Detection of Staphylococcal Enterotoxins. Food Matrices. Toxins (Basel). v. 8, n. 4, p. 107, 2016.

NOCKER, A, CHEUNG, C. Y.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. J. Microbiol. Methods, v. 67, p. 310-320, 2006.

NOGUCHI, N. et al. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic resistance genes qacA/B and smr of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. J Med Microbiol., v. 54, p. 557–565, 2005.

O'BRIEN, M et al. Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. Food Microbiol., v. 26, n. 8, p. 910-914, 2009.

OKADA, M., et al. Adsorption and desorption behaviors of cetylyridinium chloride on hydroxyapatite nanoparticles with different morphologies. Dental Materials Journal, v. 35, p. 651-658, 2016

OKSANEN, J. et al. vegan: Community Ecology Package. . [S.l: s.n.]. Disponível em: https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>, 2019.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÔES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. Toxins (Basel), v. 10, p. 252, 2018.

OLIVEIRA, L. G. Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de queijo minas artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG. 2014. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

OMBARAK, R. A. et al. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. J. Food Microbiol., v. 221, p. 69-76, 2016.

ORNELLAS, E. A. Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra-MG. 2005. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, 65f. Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte, 2005.

ORTEGA-MORENTE, E. et al. Biocide tolerance in bacteria. J. Food Microbiol, v. 162(1), p. 13-25, 2013.

ORTOLANI, M. B. T. et al. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. Foodborne Pathog., Dis. v.7, p. 175-180, 2010.

OXARAN, V. et al. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail product. Food Microbiol., v. 68, p. 16-23, 2017.

PARADIS, E.; SCHLIEP, K. Ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. Bioinformatics, v. 35, n. 3, p. 526–528, 2019.

PAUL, D.; CHAKRABORTY, R.; MANDAL, S. M. Biocides and health-care agents are more than just antibiotics: Inducing cross to co-resistance in microbes. Ecotox. Environ. Safe, v. 174, p. 601-610, 2019.

PEDROSA, F. R. V. Pesquisa de Salmonella spp. em queijos Minas meia-cura obtidos em feiras livres da cidade de São Paulo. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PERESI, J. T. M. et al. Queijo Minas tipo frescal artesanal e industrial, qualidade microscópica, microbi ológica e teste de sensibilidade a os agentes antimicrobianos. Hig. Aliment., v. 15, n. 83, p. 63-70, abr. 2001.

PERIN, L. M. et al. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture dependent and independent methods. J. Food Microbiol., v. 65, p. 160-169, 2017.

PERIN, L. M. et al. Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. J. Food Microbiol., v. 214, p. 159-167, 2015.

PICOLI, S. U. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, p. 64-69, 2006.

PIELOU, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. J. Theor. Biol., v. 13, n. C, p. 131-144, 1966.

PINCHUK, I. V. et al. 2010. Staphylococcal Enterotoxins. Toxins v. 2, p. 2177-2197, 2010.

PINTO, M. S. et al. Physicochemical and microbiological characteristics of traditional Minas cheese produced in the micro-region of Montes Claros – MG. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 71, n. 1, p. 43-52, 2016.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. PLoS ONE, v. 5, n. 3, 2010.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research, v. 41, n. D1, 2013.

RAIMUNDO, D. C. *Listeria monocytogenes* em queijo Minas meia cura: Análise quantitativa, caracterização qualitativa e molecular de isolados. 2013. 52f. Tese de doutorado Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

RESENDE, M. F. S. et al. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 63, p. 1567-1573, 2011.

REY, D.; NEUHÄUSER, M. Wilcoxon-Signed-Rank Test. In: LOVRIC, M. (Org.). International Encyclopedia of Statistical Science. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 1658–1659, 2011.

ROCHA, J. S. et al. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. Arq. Bras. Med.Vet. Zootec., v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

RUIZ-LINARES, M., et al. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutants* biofilm. Ann Clin. Microbiol. Antimicrob., v. 13, n. 41, 2014.

RUSSELL, A. D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. J. Hosp. Infect., v. 57, p. 97-104, 2004.

RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. Lancet Infect. Dis., v. 3, n. 12, p. 794–803, 2003.

SÁDECKÁ, J. et. al. Microbial diversity and volatile odour-active compounds of barrelled ewes' cheese as an intermediate product that determines the quality of winter bryndza cheese. Food Sci. Technol., v. 70, p. 237-244, 2016.

SAHRAOUI, Y. et al. Antibacterial and technological properties of *Lactococcus lactis* spp. lactisKJ660075 strain selected for its inhibitory power against *Staphylococcus aureus* for cheese quality improving. J. Food Sci. Tech., v. 52, p. 7133-7142, 2015.

SAIFULLAH, M. K. et al. Molecular detection of Salmonella spp. isolated from apparently healthy pigeon in Mymensingh, Bangladesh and their antibiotic resistance pattern. J. Adv. Vet. Anim. Res., v.3, p. 51-55, 2016.

SALES, G. A. Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá-MG durante a maturação em diferentes épocas do ano. 2015. 106f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Minas Gerais, 2015.

SANT'ANNA, F. M. et al. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. Food Microbiology, v. 82, p. 349–362, 2019.

SANTOS COSTA, S. et al. Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol., v. 15, p. 232, 2015.

SCENIHR. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides, p. 24-25. Jan. 2009. Disponível em < https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf> Acesso em: 10 jul. 2020.

SCHLEIFER, K.; BELL, J. A. Genus I *Sthaphylococcus* Rosenbach 1884. In: DeVOS, P., Garrity, G.M., Jones, D. et al. (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2a ed. V. 3, New York, Springer, p. 392-421, 2009.

Schweizer, H. P. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. FEMS. Microbiology Letters v. 202, p. 1-7, 2001.

SHANNON, C. E.; WARREN WEAVER. The mathematical theory ofcommunication. The University of Illinois Press, v. 8, n. 11, p. 21–33, 1949.

SIDHU, M. S. et al. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. J. Antimicrob. Chemoth., v. 46, p. 2797-2803, 2002.

SILVA, C. C. G; SILVA, S. P. M.; Ribeiro, S. C. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. Front. Microbiol., v.9, p. 594, 2018.

SILVA, N., et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 5 ed. São Paulo (SP): Blucher, 2017.

SOARES, D.B. Caracterização físico-química e microbiológica do queijo minas artesanal na região de Uberlândia-MG. 2014. 124f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Minas Gerais, 2014.

SOBRINHO, P. S. C. et al. Bacteriological quality of raw milk used for production of a Brazilian farmstead raw milk cheese. Foodborne Pathog. Dis., v. 9, p. 138-144, 2012.

SREENIVASAN, P. K. et al. Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. LETT. APPL. Microbiol, v. 56, p. 1420, 2012.

TATTAWASART, U.; MAILLARD, J-Y; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D. Outer membrane changes in *Pseudomonas* to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. . J. Antimicrob. Agents., v. 16, p. 233-238, 2000.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am. J. Med. V. 119, p. 3-10, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 6. ed. São Paulo (SP): Atheneu, 2016. 920p.

TRMČIĆ, A. et al. Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. J. Dairy Sci. v. 99 n. 8, p. 6105-6120, 2016.

TULINI, F. L. WINKELSTRÖTER, L. K. DE MARTINIS E.C.P. Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese. Anaerobe, v. 22, p. 57-63, 2013.

TURCHI, B., et al. Coagulase negative staphylococci from ovine milk: Genotypic and phenotypic characterization of susceptibility to antibiotics, disinfectants and biofilm production. Small Ruminant Res., v. 183, 106030. 2020.

VALI, L. et al. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J. Antimicrob. Chemoth., v. 61, p. 524-532, 2008.

VALI, L., et al. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J. Antimicrob. Chemoth., v. 61, p. 524-532, 2008.

VAUGH, J. M. et al. Genetic diversity and virulence characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastites. Microb. Pathog., v. 144, jul. 2020.
VELLOSO, C. R. V. et al. Avaliação da composição e qualidade microbiológica dos queijos Minas Araxá, do Serro e Canastra. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 17, p. 101-105, 2003.

WAND, M. E. Bacterial Resistance to Hospital Disinfection. Advances in Environmental Microbiology, 4 ed. 2017. DOI 10.1007/978-3-319-60616-3_2.

WEBBER, M. A. et al. Quinolone-resistant gyrase mutants demonstrate decreased susceptibility to triclosan. J. Antimicrob. Chemoth., v. 72, p. 2755–2763, 2017.

WEISS, S. et al. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. Microbiome, v. 5, n. 27, 2017.

WERNER, J. J. et al. Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16s rRNA gene surveys. ISME J., v. 6, p. 94-103, 2012.

WHO. World Health Organization. Salmonella (non-typhoidal). 2016. Disponível em: < https://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html >. Acesso em: 15 jun. 2020.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. [S.l.]: Springer-Verlag New York, 2009. Disponível em: http://ggplot2.org/ Acesso em: 10 jun. 2020.

WOO, P. C. Y. C. Y. et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clin. Microbiol. Infect., v. 14 (10), p. 908-934, 2008.

ZHANG, C. et al. Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. The Science of the Total Environment, v. 518-519, p. 352-362, 2015.

ZHENG, P. X. et al. *Lactobacillus pentosus* strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multi-drug resistant *Helicobacter pylori*. J. Microbiol. Immunol., v. 49, p. 168-174. 2016.

ZHENG, P.X. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leoconostocaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., v. 70(4), p. 2782-2858. 2020.