



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

KARINNE DA COSTA PEREIRA

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO ARTESANAL DO TIPO
“MANTEIGA” COMERCIALIZADO NA REGIÃO METROPOLITANA DE MACAPÁ
NO CONTEXTO DE SAÚDE ÚNICA

Macapá
2023

KARINNE DA COSTA PEREIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO ARTESANAL DO TIPO
“MANTEIGA” COMERCIALIZADO NA REGIÃO METROPOLITANA DE MACAPÁ
NO CONTEXTO DE SAÚDE ÚNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia da Universidade Federal do
Amapá

Orientador: Prof. Dr. Aldo Aparecido
Proietti Junior

Co-orientadora: Dra. Luciana Sampaio
Lima.

Macapá
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP
Elaborado por Mário das Graças Carvalho Lima Júnior – CRB-2 / 1451

P436 Pereira, Karinne da Costa.

Qualidade microbiológica do queijo artesanal do tipo “manteiga” comercializado na região metropolitana de Macapá no contexto de saúde única / Karinne da Costa Pereira. - Macapá, 2023.

1 recurso eletrônico. 43 folhas.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Curso de Farmácia, Macapá, 2023.

Orientador: Professor Doutor Aldo Proietti Júnior.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Doenças veiculadas por alimentos. 2. Resistência aos antimicrobianos. 3. Saúde única.
I. Proietti Júnior, Aldo, orientador. II. Unifap. III. Título.

CDD 23. ed. – 615

PEREIRA, Karinne da Costa. **Qualidade microbiológica do queijo artesanal do tipo “manteiga” comercializado na região metropolitana de Macapá no contexto de saúde única.** Orientador: Professor Doutor Aldo Proietti Júnior. 2023. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Coordenação do Curso de Farmácia. Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2023.

KARINNE DA COSTA PEREIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO ARTESANAL DO TIPO
“MANTEIGA” COMERCIALIZADO NA REGIÃO METROPOLITANA DE MACAPÁ
NO CONTEXTO DE SAÚDE ÚNICA**

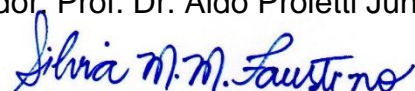
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia da Universidade Federal do
Amapá

Data de Aprovação: 18 de abril de 2023



Aldo Proietti Junior
Orientador de Curso
UNIFAP

Orientador: Prof. Dr. Aldo Proietti Junior – UNIFAP



Silvia M. M. Faustino

Avaliador: Prof^a. Dra. Silvia Maria Mathes Faustino – UNIFAP



Francely M. N. Cardoso

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha família pelo suporte por todos esses anos.

A Dra. Luciana Sampaio por todo apoio, ajuda e ensinamentos dado durante toda a minha permanência no Laboratório Especial de Microbiologia Aplicada. Ao Professor Dr. Aldo Proietti-Junior por toda a paciência e por ter me aceitado na sua equipe.

Especialmente meus amigos que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis e incentivo para continuar.

“Mas é claro que o sol vai voltar amanhã.

Mais uma vez, eu sei”

Renato Russo

RESUMO

No Brasil é comum a comercialização de queijos produzidos de forma artesanal, e quando este processo é realizado por pessoas que não possuem uma capacitação adequada pode acarretar contaminação por microrganismos patogênicos para o homem. O presente trabalho tem como objetivo a avaliação microbiológica dos queijos vendidos nas feiras livres localizadas na região metropolitana de Macapá, buscando identificar especificamente isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* conforme a Instrução normativa N° 60, de 23 e dezembro de 2019. As coletas são realizadas em quadruplicatas em cada uma das feiras selecionadas entre as que ocorrem em dias alternados e que a comercialização não seja fixa. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo reutilizável em sacos plásticos estéreis identificados e lacrados e encaminhadas ao Laboratório Especial de Microbiológica Aplicada (LEMA). Entre as amostras analisadas foram selecionados isolados bacterianos suspeitos de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* caracterizadas como resistentes a ceftriaxona. Após confirmação fenotípica da presença desses microrganismos, conclui-se que resultados demonstram qualidade microbiológica insatisfatória, havendo risco de disseminação de microrganismos resistentes à Ceftriaxona (cefalosporina de terceira geração) a qual pode ser relacionada a produção de beta lactamases de espectro ampliado. Tais achados implicam na necessidade de ações urgentes dentro do contexto de saúde única, visto que a resistência antimicrobiana é uma ameaça para os seres humanos, animais, plantas e meio ambiente, dificultando a forma de tratamento e controle de doenças. Portanto, é importante incentivar e orientar os produtores quanto as boas práticas de produção, higiene e manipulação para obtenção de alimentos seguros para consumo.

Palavras-chave: Doenças veiculadas por alimentos. Resistência aos antimicrobianos. Saúde única. Qualidade microbiológica. Queijo Artesanal.

ABSTRACT

In Brazil it is common to commercialize cheeses produced in an artisanal way, and when this process is carried out by people who do not have an adequate training can cause contamination by pathogenic microorganisms for man. This study aims to evaluate the microbiological cheeses sold at open markets located in the metropolitan region of Macapá, seeking to identify specifically isolates of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in accordance with Instrução normativa N° 60, de 23 e dezembro de 2019. The collections are carried out in quadruplicates in each of the selected fairs among those that occur on alternate days and that the marketing is not fixed. The samples were transported in isothermal boxes with reusable ice in sterile plastic bags identified and sealed and sent to Laboratório Especial de Microbiológica Aplicada (LEMA). Bacterial isolates suspected of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* characterized as resistant to ceftriaxone. After phenotypic confirmation of the presence of these microorganisms, it is concluded that results demonstrate unsatisfactory microbiological quality, with a risk of dissemination of microorganisms resistant to Ceftriaxone (cephalosporin third generation) which can be related to the production of beta lactamases of extended spectrum. These findings imply the need for urgent actions within the context of unique health, since antimicrobial resistance is a threat to humans, animals, plants and the environment, making it difficult to treat and control diseases. Therefore, it is important to encourage and guide producers on good production, hygiene and handling practices to obtain safe food for consumption.

Palavras-chave: Foodborne illnesses. Antimicrobial resistance. Unique health. Microbiological quality. Artisanal cheese.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	OBJETIVOS.....	10
2.2	OBJETIVOS GERAIS.....	10
2.3	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	10
3	REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	12
3.1	QUEIJO.....	12
3.2	QUALIDADE MICROBIOLÓGICA.....	14
3.2.1	<i>Salmonella</i> spp.....	14
3.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	16
3.2.3	<i>Escherichia coli</i>.....	16
3.3	PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	17
3.4	RESISTÊNCIA A CLASSE DOS BETA-LACTÂMICOS.....	19
3.5	SAÚDE ÚNICA.....	20
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	TIPO DE ESTUDO.....	20
4.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE QUEIJO.....	20
4.3	PREPARO DAS AMOSTRAS DE QUEIJO.....	21
4.3.1	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	21
4.3.2	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	22
4.3.3	Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	23
4.4	PROVAS BIOQUÍMICAS	24
4.5	MÉTODO DISCO-DIFUSÃO.....	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1	FEIRAS LIVRES.....	27
5.2	TESTE DE FENOTIPAGEM.....	28
5.2.1	<i>Salmonella</i> spp.....	29
5.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	29
5.2.3	<i>Escherichia coli</i>	30
5.3	MÉTODO DISCO-DIFUSÃO.....	31
6	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

A comercialização de queijos em feiras livres é realizada de forma cotidiana nos estados do Norte e Nordeste, mas a prática da produção destes queijos de forma artesanal foi originada possivelmente com a vinda dos portugueses ao Brasil, desde então obteve diversas adaptações e variações de acordo com cada localidade do país (ARAÚJO et al., 2020).

Na região metropolitanas de Macapá-AP ocorrem, de forma habitual, feiras ao ar livre, atraindo pequenos agricultores e produtores advindos de municípios menores a realizarem a comercialização de seus produtos. Os frequentadores destes ambientes muitas das vezes realizam estas visitas com objetivo de encontrar alimentos e produtos de maior qualidade por serem frescos e artesanais, diferente dos produtos encontrados em supermercados. Porém o ambiente no qual essas mercadorias ficam expostas pode ser foco de contaminação por diversos fatores como a exposição de forma inadequada, o manuseio sem a utilização de materiais higienizados, o estoque e sua proteção realizados de forma inapropriada (MARTINS; FERREIRA, 2018).

Um dos produtos comercializados é o queijo, que possui grande variedade, dentre elas então incluídos os queijos do tipo “manteiga” e bubalino, porém seus produtores muitas das vezes não utilizam de técnicas higiênico-sanitárias e boas práticas no processo da sua produção de forma artesanal, desde a coleta do leite, a produção dentro de sua moradia sob condições inadequadas, armazenamento e transporte até a feira, colaborando para contaminação do mesmo (FRAZÃO et al., 2021).

As infecções de origem alimentar são um problema de saúde pública, e os laticínios por sua vez vêm demonstrando um potencial propagador de doenças transmitidas por alimentos (DTA), isso se intensifica no caso dos queijos por terem origem do leite cru (MERUSSI et al., 2013; MORAIS et al., 2019; LUZ et al., 2022).

Um dos parâmetros utilizados para o estabelecimento de boas condições no processamento do alimento são os coliformes, que quando presentes indicam que o produto não foi manipulado sob condições de higiene adequadas. Dentre os microrganismos indicadores de padrões microbiológicos para queijos encontram-se os coliformes termotolerantes no documento de referência indicada pela *Escherichia*

coli, indicador de contaminação fecal recente, *Staphylococcus aureus*, produtor de toxina termoestável pré-formada no alimento e *Salmonella* spp (SOARES et al., 2018).

Estudos mais aprofundados da propagação destas bactérias veiculadas pelo queijo são necessários, visto que algumas dessas estirpes bacterianas possuem inúmeros fatores de virulência que elevam sua patogenicidade e possuem ainda a capacidade de transmitir genes de resistência, limitando as opções de tratamento se tornando um problema grave no contexto a saúde única (BONFIM et al.,2020).

Desta forma, considerando os riscos que os queijos contaminados por bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos podem causar a saúde da população, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise e apuração da qualidade higiênico sanitária dos queijos comercializados nas feiras livres localizadas na região metropolitana de Macapá, com a finalidade de levantar dados acerca da propagação destes patógenos, sua possível resistência frente à cefalosporina de terceira geração Ceftriaxona e a partir dos resultados propor a colaboração entre os setores para preservar a eficácia desses medicamentos essenciais. Combater a resistência frente aos antimicrobianos é um esforço verdadeiramente global e deve ser melhor discutido por meio de uma abordagem de saúde única.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a qualidade microbiológica e caracterização fenotípica da resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos comercializadas nas feiras livres da região metropolitana de Macapá.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar presença ou ausência de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* nas amostras coletadas;
- Investigar a ocorrência de fenótipos críticos de resistência aos antimicrobianos em bactérias isoladas das amostras;

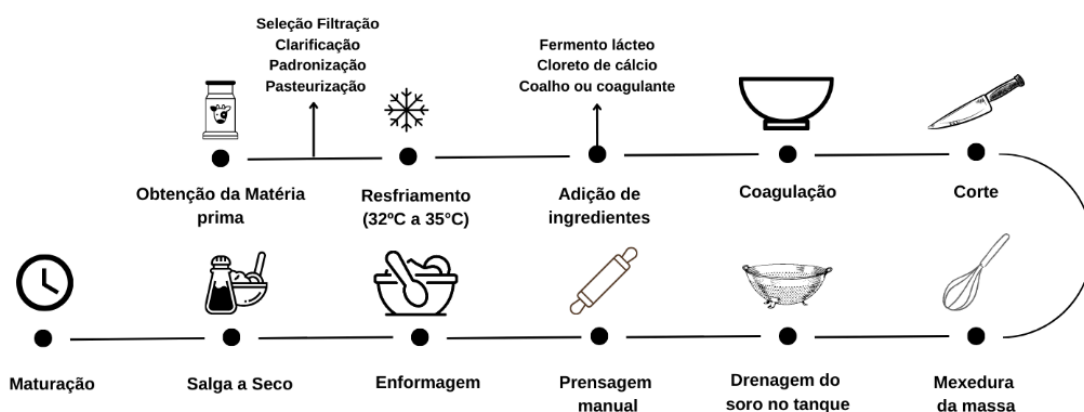
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 QUEIJO

De acordo com a Portaria Nº 146, DE 07 de março de 1996 o queijo é obtido através do processo de separação do soro do leite. Seus relatos vêm desde 5.000 anos a.C., neste período, os pastores perceberam que quando o leite coletado das suas cabras e ovelhas acidificava, ocorria a separação entre o soro e a massa, ao moldarem este material formava um alimento nutritivo, e com o tempo começaram a salgar e desidratar melhorando sua qualidade de armazenamento e conservação (PAULA et al., 2009).

O queijo é o laticínio que possui um grande número de variações em todo o mundo, tanto em aparência quanto em sabor, mas todas mantendo sua qualidade nutritiva. No Brasil, cada estado também apresenta variações na forma de preparo a exemplo do queijo Minas, queijo “manteiga”, queijo coalho entre outros. Apesar de possuírem pequenas alterações na elaboração, possuem similaridade em algumas etapas, como mostra a figura 1, e se classificam pelo método de coagulação. Um destes processos é o da pasteurização, que ocorre na preparação do leite, consistindo em um processo térmico com o objetivo de acabar com os possíveis microrganismos patogênicos incluindo aqueles que favorecem a degradação do mesmo (PERRY,2004).

Figura 1 – Etapas básicas da fabricação do queijo



Fonte: Autoria própria com auxílio da ferramenta Canva (2022)

Em razão disto, agência nacional de vigilância sanitária vem atualizando suas regulamentações como a instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019 da ANVISA que estabelece a lista de padrões microbiológicos para alimentos, os valores de qualidade microbiológica são representados pelas letras “n”, “c”, “m” e “M” e são definidos como: plano de amostragem: componente do padrão microbiológico que define o número de unidades amostrais a serem coletadas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente assim, (n), o tamanho da unidade analítica e a indicação do número de unidades amostrais toleradas com qualidade intermediária (c) e limite microbiológico m (m): limite que, em um plano de três classes, separa unidades amostrais de "Qualidade Aceitável" daquelas de "Qualidade Intermediária" e que, em um plano de duas classes, separa unidades amostrais de "Qualidade Aceitável" daquelas de "Qualidade Inaceitável" e limite microbiológico M (M): limite que, em um plano de três classes, separa unidades amostrais de "Qualidade Intermediária" daquelas de "Qualidade Inaceitável", como mostrado no Quadro 1 (BRASIL, 2019).

Quadro 1 - Padrões microbiológicos estipulados para queijos

GRUPO ALIMENTAR 9 – LEITES E DERIVADOS					
Categories específicas	Microrganismo	n	c	m	M
b) Queijos	Enterotoxinas estafilocócicas (ng/g)	5	0	Aus	-
	<i>Salmonella</i> /25g	5	0	Aus	-
	Estafilococos coagulase positiva/g	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Escherichia coli</i> /g, para queijos ralado ou em pó	5	2	10 ²	5x10 ²
	<i>Escherichia coli</i> /g, para queijos com umidade abaixo de 46%	5	2	10	10 ²
	<i>Escherichia coli</i> /g, para queijos com umidade igual ou acima de 46%	5	1	10 ²	10 ³

Fonte: BRASIL, 2019 (adaptado).

Assim, de acordo com a IN nº60/2019 os indicadores de qualidade microbiológica para o queijo “tipo manteiga” deverão respeitar os seguintes valores limites: *Salmonella* spp. (ausência em 25g), *Estafilococos* coagulase positiva (10³/g),

Enterotoxinas estafilocócicas (ausência em ng/g) e *Escherichia coli* (10^3 /g) (BRASIL, 2019).

Embora estes órgãos imponham parâmetros a serem seguidos no processo de obtenção do queijo, a maior parte da sua fabricação e comercialização é realizada em pequenos estabelecimentos de forma artesanal, não sendo fiscalizados de forma regular, contribuindo para uma cadeia de processos que levam a falta de controle de qualidade do produto (DIAS et al., 2016; XAVIER, 2020).

A produção de queijos de forma artesanal no Brasil é, para muitas famílias, uma contribuição para seu sustento, esta comercialização muitas das vezes é vista em feiras ao ar livre ou em pequenos estabelecimentos (VINHA et al., 2010). Porém muitos fatores como ordenha, transporte e conservação da matéria prima podem levar a uma contaminação. (FRAZÃO et al., 2021).

3.2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA

Os fatores que contribuem para uma boa qualidade microbiológica são determinados pela boa qualidade da matéria prima, o leite cru, e os processos da pasteurização até a embalagem. Naturalmente existe uma vulnerabilidade à contaminação por diversos microrganismos levando a perda da qualidade o deixando impróprio para consumo (PAULA et al., 2009).

A principal fonte de contaminação é ocasionada pelas bactérias do grupo coliformes, que são capazes de fermentar a lactose e gerar CO₂, levando a um estufamento no alimento e uma deterioração precoce, além de infecções alimentares. Estes quando presentes, indicam uma falta de higiene no manuseio e fabricação, uma vez que estes microrganismos patogênicos indicadores de qualidade seriam eliminados ou reduzidos aos valores aceitáveis conforme prevê a normativa nº60/2019, se caso o processo de pasteurização ocorresse de forma adequada, dentre eles estão *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria* spp., detectados em diversos estudos com amostras alimentares (PERRY, 2004; PAULA et al., 2009; FERREIRA, 2011).

3.2.1 *Salmonella* spp

Salmonella é uma bactéria que pode causar intoxicação alimentar em seres humanos, conhecida como salmonelose, e em casos raros, pode provocar graves infecções e até mesmo a morte. É eliminada nas fezes de indivíduos portadores, pois seu principal nicho é o intestino de animais e seres humanos. Também pode estar presente no trato intestinal de pássaros e répteis, e ocasionalmente em insetos. Esta bactéria está caracterizada em um gênero de duas espécies: *Salmonella enterica*, com 2.610 sorovares, e *Salmonella bongori*, com 23 sorovares (BRASIL, 2022)

Seu controle é um problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento, sendo um dos principais causadores de infecções alimentares, isso se dá pela dificuldade na identificação e diferenciação da sintomatologia da doença, desta forma é essencial uma intensa fiscalização no gênero alimentício evitando a infecção desta doença pelo ser humano, prejudicando a economia, uma vez que países que sofrem surtos de *Salmonella* spp. passam por dificuldades em exportação e em gastos médicos (SHINOHARA et al., 2008).

É encontrado no trato intestinal de homens e animais na natureza, podendo se distribuir pelo ambiente em locais variados, incluindo alimentos, podendo ter como transportador o ser humano quando o mesmo não apresenta sintomas, porém continua transmitindo a patologia. O gênero possui três grandes grupos: *Salmonella enterica* sorovar Typhi, agente etiológico da febre tifoide, *Salmonella enterica* sorovar Paratyphi agente etiológico das febres entéricas e outros sorovares que causam doenças como as enterocolites e salmoneloses. No momento atual um dos motivos de preocupação é o surgimento de classes sorológicas que possuem resistência a antimicrobianos, dificultando o tratamento destes pacientes infectados, por este motivo não é indicado tratar gastroenterites com antibióticos. (CARDOSO; DE CARVALHO, 2006; SHINOHARA et al., 2008).

Pesquisas realizadas em várias regiões do Brasil demonstraram a presença de *Salmonella* spp. em queijos e produtos lácteos, principalmente aqueles feitos de forma artesanal, a detecção desta bactéria nestes alimentos é associada a forma de transmissão, que ocorre por meio de água e alimentos contaminados com fezes infectadas, envolvendo não só a manipulação destes alimentos de forma inapropriada, como também o uso de materiais não adequados e matéria prima de má procedência. (FEITOSA et al., 2003; BORGES; ANDRADE; MACHADO, 2010)

3.2.2 *Staphylococcus aureus*

Outro fator microbiológico que afeta leites e queijos são as enterotoxinas, produzidas pelo gênero *Staphylococcus*, levando a graves problemas de toxinfecção alimentar constituindo as doenças transmitidas por alimentos mais comuns. Alguns dos sintomas são a diarreia, vômito e dor abdominal, os sintomas podem ter agravante dependendo diversos fatores como idade, peso e estado de saúde (BORGES et al., 2008).

Estirpes de *S. aureus* representa a principal produtora de enterotoxinas do gênero, sendo a mais encontrada nos queijos, diferente das células bacterianas que são facilmente eliminadas em altas temperaturas, as enterotoxinas estafilocócicas liberadas pela espécie possuem características como resistência às enzimas do sistema digestivo, e capacidades termoresistência, que as mantêm ativas em queijos e laticínios após serem submetidas ao processo de pasteurização inadequada e/ou ineficiente (SENGER; BIZANI, 2011).

3.2.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é encontrada como componente da microbiota residente no trato gastroentérico do ser humano e, apesar de algumas variedades serem inofensivas para a saúde comportando como comensais ou simbiotes, outras estão relacionadas a infecções relacionadas a alimentos contaminados. Quando detectadas em amostras alimentares indicam a contaminação recente por fezes e, portanto, falta de cuidados de higiene (FRAZÃO et al., 2021).

A classificação é feita através da sorotipagem e da detecção da presença de fatores de virulência, as linhagens patogênicas da *E. coli* são: *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC), sendo que cada cepa apresenta características clínicas diferentes (ROSA et al., 2016).

As estirpes de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), quando em contato com o tecido epitelial leva a uma diarreia com a presença algumas das vezes de sangramento por conta da escoriação de microvilosidades. Devido ao

desenvolvimento da imunidade protetora, esta classe afeta na maioria das vezes crianças principalmente que apresentam condição socioeconômica comprometida, que vivem em países pobres e sem condições de saneamento adequadas. Outros sorovares que também levam ao aparecimento de diarreia e que afetam crianças tanto de países desenvolvidos quanto países em desenvolvimento são: ETEC, EAEC, e a DAEC. (SOUZA et al., 2016).

A resistência de *E. coli* a diferentes agentes antimicrobianos têm sido recorrentemente relatada em alimentos, com ênfase nas classes das quinolonas e beta-lactâmicos. Sua capacidade de transferir genes para outras bactérias da mesma forma é reportada rotineiramente, fator que contribui de maneira impactante na disseminação da resistência bacteriana (LIMA et al., 2022).

3.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os agentes antimicrobianos são substâncias químicas naturais, sintéticas ou semi-sintéticas que atuam em receptores moleculares bacterianos, podendo assim modificar fisiologicamente, biologicamente e bioquimicamente aspectos funcionais ou estruturais dos microrganismos nos quais ela interage, assim gerando uma deficiência fisiológica na célula bacteriana (KUMMERER, 2004).

Estas drogas agem através de mecanismos que promovem as inibições de funções reprodutivas (bacteriostáticos) ou deficiências em processos vitais, causando assim a morte dos microrganismos alvo (bactericidas) (MACHADO et al., 2019). São denominados fármacos bacteriostáticos aqueles que promovem alterações nas funções reprodutoras das bactérias, assim a microbiota afetada não conseguirá se reproduzir, e posteriormente será inativada por ação do sistema imunológico do organismo infectado. Já fármacos bactericidas provocam alterações fisiológicas consideradas vitais para a bactéria, assim provocando a morte do microrganismo (GUIMARÃES et al., 2010).

Nas últimas décadas é identificado o aumento exponencial nos casos de resistência bacteriana frente aos antimicrobianos, sendo configurado como problema de saúde pública emergente no mundo todo ameaçando o bem-estar do ser humano, dificultando o tratamento e controle de doenças causadas por patógenos,

principalmente as infecções hospitalares, leva a uma movimentação da indústria farmacêutica e elevação das estimativas hospitalares (RODRIGUES et al, 2018).

Esta resistência pode ocorrer de forma intrínseca que faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo, fazendo, portanto, parte da herança genética do microrganismo ou ser adquirida que ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível à droga em questão, esta caracterização pode ser fruto de modificações em receptores, estruturas e mecanismos fisiológicos, que são alvos dessa classe de fármacos e então transmiti-las aos seus descendentes Quadro 2 (SILVA, 2018).

Quadro 2 - Mecanismos de transferência de genes de resistência

Mecanismo	Descrição do mecanismo
Transformação	É a capacidade de a bactéria transferir seu DNA para outra, pode ser realizado na morte da bactéria, assim outras bactérias podem captar, assim assimilando o material.
Transdução	Baseia-se na capacidade de transferência de DNA, ou parte do DNA, de uma bactéria para outra através dos bacteriófagos, que utilizam esse material para se replicar, assim assimilando os genes de resistência.
Conjugação	Baseia-se no contato de duas bactérias, podendo ser físico ou pela organela fímbria sexual, no caso das Gram-negativas, ou pelos cocos, pelas Gram-positivas. Nesse contato há a troca de material genético, podendo ter genes de resistência.
Transposição	É a capacidade de transferência dos genes de um plasmídeo para outro, podendo ser para um cromossomo ou para um bacteriófago, ocorrendo dentro de uma célula.

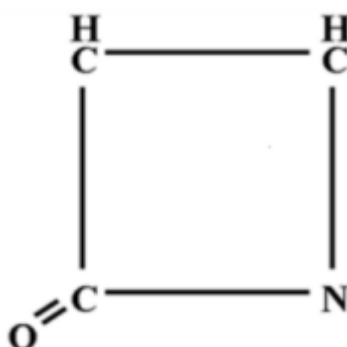
Fonte: SILVA; MENDONÇA, 2012; ANDERSSON; HUGHES, 2017; VIROLLE et al., 2020.

Os fatores que implicam na disseminação da resistência aos agentes antimicrobianos incluem: a parte clínica representada pelo uso abusivo e/ou desnecessário, contaminação ambiental, movimento geográfico de seres vivos infectados estão entre os principais contribuintes para a proliferação da resistência aos antimicrobianos, pois em todos os lugares há reservatórios de resistência, como humanos, animais, o solo, a água, hospitais, sendo interligados na sua propagação e afetando o ecossistema (DA COSTA; JUNIOR, 2017).

3.4 RESISTÊNCIA A CLASSE DOS BETA-LACTÂMICOS

Esta classe de antimicrobianos possui um anel beta-lactâmico em sua estrutura, sendo responsável pela propriedade inibitória da parede celular bacteriana, responsável pela forma que esta classe de antibióticos atua. Dentro desta classe a forma de diferenciação é o anel no qual os beta-lactâmicos estão ligados, já que o Anel-Beta-Lactâmico é composto por três átomos de carbono e um de nitrogênio ligado a um radical presente na estrutura química como mostra a Figura 2. Estas variações da localização do anel vão refletir em como se comporta a afinidade do antibiótico pelo receptor, característica de ação, e como a bactéria vai desenvolver determinada resistência ao mesmo (DE ARRUDA et al., 2019).

Figura 2 - Representação do anel beta-lactâmico.



Fonte: AZEVEDO (2014).

A resistência contra medicações aos antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos está relacionada a produção de beta-lactamases, que são enzimas produzidas pelas bactérias alvo, que realizam a hidrólise do anel beta-lactâmico pela quebra da ligação, assim inativando a ação farmacológica. Essas enzimas podem ser detectadas em uma ampla gama de espécies bacterianas, como na ordem dos *Enterobacterales* (TOOKE et al., 2019).

Dentro desse grupo encontra-se a classe das cefalosporinas que foram introduzidas na década de 60, pelo fato de as penicilinas não serem mais efetivas contra estafilococos. São classificadas em cefalosporinas de 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª geração. Atualmente o grupo mais abrangente das cefalosporinas é o das de terceira geração, devido às suas características farmacocinéticas e ao seu ampliado espectro de ação. A ceftriaxona é uma cefalosporina de terceira geração muito usada

atualmente. É uma droga que age inibindo a síntese da parede microbiana, possuindo amplo espectro de ação contra bactérias gram-negativas (SILVA, 2006).

3.5 SAÚDE ÚNICA

A saúde única está entrelaçada com a capacidade de promover a qualidade de vida humana, animal e do ecossistema através da tomada de medidas a fim de precaver a ampliação de crises relacionadas a estes três setores. Dentro do mercado consumidor é necessário que os produtos oriundos de animais possuam normas e padrões a serem adotados para serem seguros para consumo prevenindo crises sanitárias (GONZALES et al., 2017).

No entanto um problema que está atualmente afetando a saúde animal, humana e ambiental é a resistência aos antimicrobianos, com o crescimento da disseminação de novos genes resistentes causada por fatores como o uso irracional de antimicrobianos, falta de controle de infecções ou até inexistência e fiscalização inadequada de produtos comercializados (BRASIL, 2019)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo qualitativo e quantitativo, com caracterização fenotípica de bactérias isoladas de queijos comercializados em feiras livres da região metropolitana de Macapá.

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE QUEIJO

As amostras foram coletadas entre os meses de novembro e fevereiro de 2022 na região metropolitana de Macapá. Foram escolhidas quatro feiras dentro destas localidades. Em cada feira eram realizadas quatro coletas de diferentes produtores. Após serem adquiridas, as amostras foram identificadas e colocadas em recipientes estéreis, sendo encaminhadas ao Laboratório Especial de Microbiologia (LEMA) localizado na Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). O transporte foi

realizado dentro de uma caixa isotérmica, mantida sob refrigeração, a temperatura de $6 \pm 2^\circ\text{C}$ até o momento das análises.

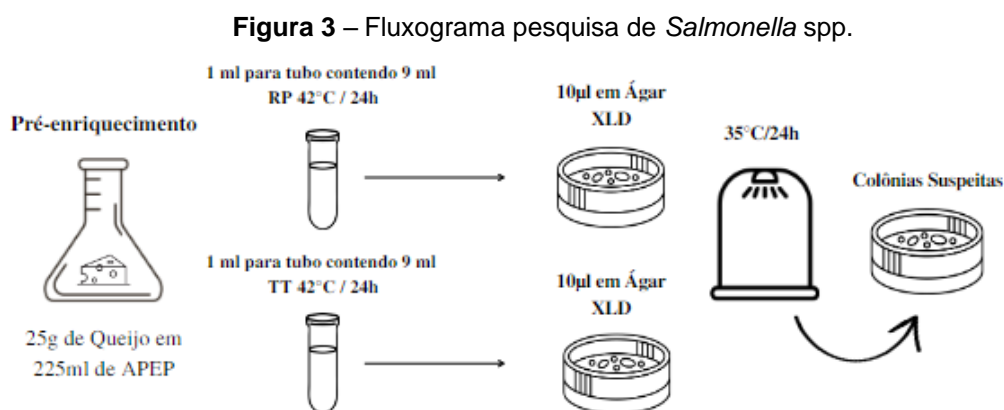
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS DE QUEIJO

Inicialmente as amostras foram pesadas em balança analítica para se obter 25g conforme descrito na Instrução Normativa Nº 62/2003 do Ministério da Agricultura. Em seguida, foram colocadas em sacos esterilizados contendo 225 ml de água peptonada a 0,1% e homogeneizadas por aproximadamente 5 minutos para a obtenção da primeira diluição (10^{-1}), e incubadas a 37° por 24h para fins de pré enriquecimento e posteriormente inoculação em meios específicos.

4.3.1 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Passado o tempo de incubação inicial uma alíquota do meio pré-enriquecido foi inoculada para um tubo contendo 9 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (CRV – Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA©) e incubado estufa a $42^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}/24\text{h}$, e 1mL para um tubo com 9mL de Caldo Tetrionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn- Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) e incubado em estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}/24 \pm 3$ horas.

A partir do enriquecimento seletivo foram procedidas técnicas de isolamento em Ágar Xilose Desoxicicolato (XLD - Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA), por meio da técnica de esgotamento com alça esterilizada e descartável de $10\mu\text{l}$, logo em seguida houve incubação em $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/24\text{h}$ seguindo fluxograma representado na Figura 3.



Fonte: Autoria própria com auxílio da ferramenta Canva (2022)

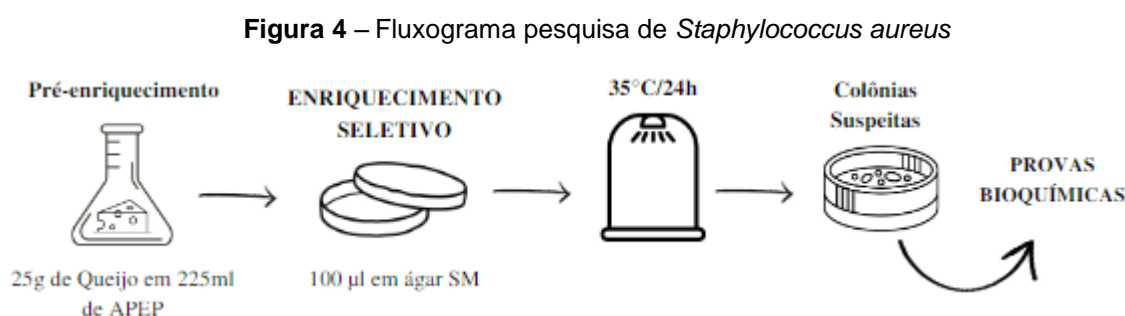
Colônias com comportamento bioquímico suspeito no meio XLD são aquelas que as colônias contêm coloração vermelho-amareladas com centros negros. Colônias com comportamento bioquímico sugestivo desse gênero foram inoculadas em meios de Tríplice Açúcar Ferro (TSI - Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) e inoculadas em meios de Identificação Bioquímica Presuntiva para confirmação da espécie

O meio de triagem TSI foi utilizado para diferenciação de bacilos Gram-negativos, observando-se o processo de fermentação, indicada pela alteração da cor do meio para amarelo na base (ácida) com ou sem produção de CO², que forma gases no meio. A cor negra na base do tubo pode indicar formação de um precipitado decorrente de H²S combinado com ferro.

4.3.2 Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

Após o período de pré- enriquecido de Água Peptonada houve a inoculação em meio de diferenciação Ágar Sal Manitol (MLA - Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA©), por meio da técnica de esgotamento com incubação a 37°C por 24h. Este meio é seletivo para estafilococos patogênicos e para a diferenciação de *S. aureus* de outros *Staphylococcus*, através da capacidade de fermentação do manitol, a formação do halo amarelo ao redor das colônias é indicativo para *S.aureus*.

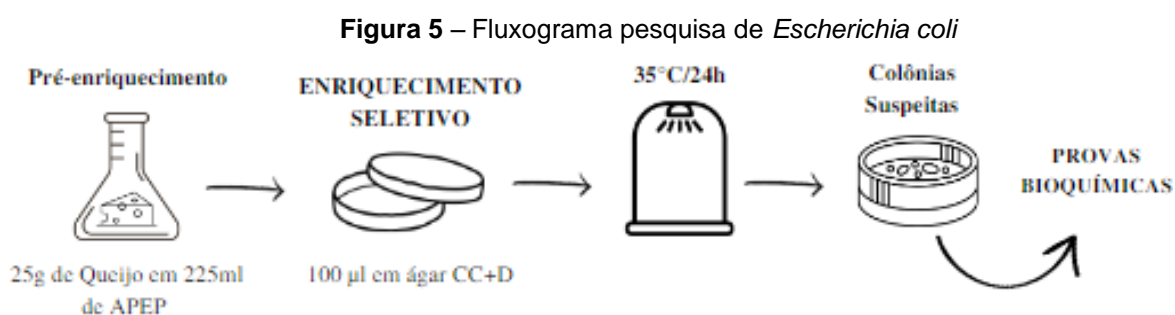
Os isolados com morfologia compatível com a espécie foram armazenados em meio Agar Triptona de Soja conforme Figura 4, para realização de testes bioquímicos para confirmação e identificação.



Fonte: Autoria própria com auxílio da ferramenta Canva (2022)

4.3.3 Pesquisa de *Escherichia coli*

A partir do meio enriquecido uma alíquota foi semeada no meio de cultura Coliforms Chromogenic Agar (CCA) ISO 9308® (KASVITM Laboratórios Conda S.A., Spain©), suplementado com Ceftriaxona (2µg/mL), adaptado do protocolo de Jacob et al. (2020), utilizando técnicas de inoculação por esgotamento e posterior incubação em estufa (Olidefcz®) a 37 °C durante 24 h conforme Figura 5.



Fonte: Autoria própria com auxílio da ferramenta Canva (2022)

O meio de cultura cromogênico é utilizado para análise de coliformes e termotolerantes, sendo um meio de cultura seletivo, devido a presença do substrato Tergitol® 7 (Sulfato de Sódio Heptadecil) que desfavorece e inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas ao mesmo tempo que não causa qualquer tipo de interferência ao crescimento de bacilos Gram-negativos.

O meio possui em sua composição o substrato de Salmon-Gal (6-Chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) que reage com a enzima constitutiva GAL dos coliformes, causando a coloração característica salmão para vermelho. A reação 31 específica que indica *E. coli* baseia-se na enzima GUD que reage com o substrato Xgluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glicuronato e sal ciclohexilamônio) causando a coloração azul-escura a violeta no meio de cultura, assim podendo haver a diferenciação pela coloração entre colônias de *E. coli* de outros coliformes (TURNER et al., 2000).

Foram selecionadas as colônias isoladas sugestivas de *E. coli*, por apresentarem a característica de coloração azul escura a violeta no meio Coliforms Chromogenic Agar (CCA) ISO 9308® (KASVITM Laboratórios Conda S.A., Spain©), e estas foram submetidas a provas bioquímicas para confirmação da espécie.

4.4 PROVAS BIOQUÍMICAS

Para a confirmação das colônias suspeitas foi realizada a coleta de bactérias isoladas para realização da série bioquímica. Esta etapa teve como base o manual da ASM (YORK et al., 2005), onde pode-se observar os comportamentos bioquímicos e macroscópicos do microrganismo com os meios da série. Podendo assim correlacionar as reações observadas às características fenotípicas descritas na literatura para determinada espécie, assim podendo determinar qual é o tipo de microrganismo inoculado. Os testes bioquímicos o qual os foram submetidos os microrganismos Gram-negativos: são descritos no Quadro 3.

Quadro 3 – Testes bioquímicos

Prova bioquímica	Fundamento	Característica Positiva
Lisina	Avalia a capacidade do inoculo descarboxilar o aminoácido lisina em meio ácido, pelo uso da enzima lisina descarboxilase.	Qualquer coloração diferente do amarelo.
SIM (Motilidade e Indol)	Avalia a capacidade do inóculo em se movimentar pelo meio e remover o grupo indólico do aminoácido triptofano.	Crescimento limitado a linha da picada = motilidade negativa. Crescimento difuso em todo o meio = motilidade positiva. Indol positivo = coloração púrpura.
H ² S	Avalia a capacidade do inóculo para a produção de ácido sulfídrico.	Colônia enegrecida.
Citrato de Simmons	Avalia a capacidade do inóculo utilizar o citrato como única fonte de carbono.	Coloração azul ou crescimento no meio.
Ornitina	Avalia a capacidade do inóculo produzir ornitina-decarboxilase.	Coloração púrpura.
TSI	Avalia a capacidade do inóculo de fermentar glicose, lactose e sacarose. Capacidade de alcalinização e acidificação do meio.	Para <i>E. coli</i> : H ² S = negativa, ápice ácido, base ácida e produção de gás.

Fonte: adaptado de YORK et al. (2004).

Após a inoculação de cada isolado suspeito seguindo os padrões recomendados foi realizada a incubação em estufa a 37 °C durante 24 h para posterior leitura.

4.5 MÉTODO DISCO-DIFUSÃO

O teste de disco-difusão (Kirby-Bauer) em ágar Müller-Hinton foi empregado nos 12 isolados caracterizados como *E. coli*, que se encontravam armazenados em Ágar nutriente inclinado em temperatura de 2 a 8°C. Esses isolados foram transferidos para tubos com 5 ml de CMH (Caldo Mueller-Hinton) por meio de inoculação com alça esterilizada de 10µl, e incubados a 37 °C durante 24 h.

A partir do crescimento bacteriano no CMH, com o auxílio de um swab, realizou-se a semeadura completa na superfície da placa de AMH (ágar Müller-Hinton) com posterior adição dos discos dos antimicrobianos selecionados, distribuídos de maneira uniforme para que não fiquem a menos de 24 mm de centro a centro, com incubação em estufa bacteriológica a 37°C/ 24 horas. Os halos de inibição de cada antimicrobiano foram medidos com auxílio de uma régua calibrada (ANEXO VI-V) e categorizados pela padronização BrCAST (versão 15/03/2023). Os resultados foram medidos e interpretados como S - sensível, dose padrão; I - sensível, aumentando exposição; e R - resistente de acordo com os parâmetros para a ordem *Enterobacterales* (BrCAST/EUCAST, 2023).

Um microrganismo é categorizado como sensível dose padrão, quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico utilizando a dose padrão do agente. Este é abalizado como sensível, aumentando exposição quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico devido ao aumento da exposição, ajustando-se o regime de dosagem ou sua concentração no local de infecção e um microrganismo. Um isolado pode ser enquadrado como resistente quando há alta probabilidade de falha terapêutica mesmo quando há aumento da exposição (BrCAST/EUCAST, 2023).

Cada halo foi medido e avaliado conforme a padronização correspondente. A Tabela 1 apresenta os pontos de corte clínicos para disco-difusão, conforme cada padronização.

Tabela 1. Pontos de corte clínicos BrCAST versão 15/03/23 por disco-difusão (mm).

	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)		
Microorganismo ou antimicrobiano	S ≥	I	R <
	<i>Enterobacterales</i>		
Carbapenêmicos			
Imipenem	22	19-21	<19
Aminoglicosídeos			
Gentamicina	17	-	<17
Fluoroquinolonas			
Levofloxacino	23	19-22	<19
Tetraciclina			
Tetraciclina	-*	-*	-*
Cefalosporina			
Cefepima	27	24-26	<24
Macrolídeos			
Azitromicina	-*	-*	-*

* O traço (-) indica que o diâmetro da zona ECV não está disponível para este agente antimicrobiano

Para o estudo de *Enterobacterales* as drogas selecionadas foram a Cefepima (30µg), tratando-se de uma cefalosporina de 4ª geração, constituindo o grupo de antibióticos pertencente à classe dos beta-lactâmicos. Esta escolha se deu pelo fato dos pontos de corte de cefalosporinas para *Enterobacterales* permitirem detectar todos os mecanismos de resistência clinicamente relevantes (BrCAST/EUCAST, 2023).

Também foi utilizado o antimicrobiano Imipenem (10µg) pertencente aos carbapenêmicos, também sendo beta-lactâmicos, essa droga foi escolhida pois a detecção e a caracterização de carbapenemases são recomendadas para fins de saúde pública e controle de infecções. Dentre foram estudados os antibióticos estudados também está a gentamicina (10µg) pertencente aos aminoglicosídeos, Levofloxacino (5µg), utilizado para detectar mecanismos de resistência às fluoroquinolonas em *Enterobacterales*, e a Tetraciclina (30µg) que tem sido utilizada para prever a sensibilidade à doxiciclina no tratamento de infecções por *Yersinia*

enterocolitica tendo como halo correspondente para o disco utilizado ≥ 19 mm (BrCAST/EUCAST, 2023)

A azitromicina (15 μg) é um antimicrobiano que tem sido utilizado no tratamento de infecções entéricas, principalmente por *Salmonella Typhi* e espécies de *Shigella* spp. e utilizando o método difusão disco é possível observar que diâmetros de halo de inibição < 12 mm com disco indicam que provavelmente existem mecanismos de resistência, por estes motivos, foi também utilizada neste estudo (BrCAST/EUCAST, 2023).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FEIRAS LIVRES

As amostras coletadas de queijo nas feiras livres de Santana e Macapá, se encontravam cobertas por panos ou plástico filme, só sendo desembalados no momento do fracionamento por corte. O alimento se encontrava exposto sobre balcões com superfície porosa sem proteção, podendo causar acúmulo de impurezas, aumentando a proliferação de microrganismos. Foi possível observar a presença de animais como gatos e pombos ao redor do espaço de comercialização. Os manipuladores na sua maioria não utilizavam luvas ou paramentação, exceto uma feirante em Santana que utilizava touca na hora da venda.

No momento da coleta foi indicado que o próprio feirante realizasse a embalagem, para que parâmetros como a higiene no manuseio e asseio correto de equipamentos utilizados fosse observado, uma vez que o manejo também podem ser um fator de contaminação (LIMA; SANTOS, 2014).

A partir da visitação destas feiras foi elaborado um checklist (ANEXO I - III), segundo as normas estabelecidas pelo RDC nº216/04, avaliando no momento da obtenção das amostras o ambiente de forma visual, equipamentos e manipulação dos queijos comercializados nas três feiras visitadas (Figura 3).

Figura 3 – Feira de santana.



Fonte: Autoria própria (2023)

Diante destas informações em conjunto com uma revisão de dados referentes as feiras livres do amapá e a venda de queijos que ocorre nas mesmas, pode-se observar que não ocorre nenhum tipo de fiscalização ou controle de qualidade (FRAZÃO et al., 2021; MARTINS; FERREIRA, 2018).

5.2 TESTES DE FENOTIPAGEM

A partir das metodologias realizadas com base no protocolo descrito pelo APHA somadas as adaptações descritas nos procedimentos operacionais padrão do Laboratório Especial de Microbiologia Aplicada (LEMA) e os testes bioquímicos, foi possível investigar a possível presença ou ausência das bactérias *Salmonella* spp., *S. aureus* e *E. coli*, nas amostras de queijo coletadas em cada uma das feiras presentes no município de Santana e na cidade de Macapá como mostra o Quadro 4.

Quadro 4 – Parâmetros para avaliação da qualidade microbiológica do Queijo tipo “Manteiga”

Feiras	Amostra	Microrganismo	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
		Valor permitido (Inst. nº 60/2019)	Ausência em 25g		
	Amostra 1		Aus.	Pres.	Aus.

Feira de Santana	Amostra 2		Aus.	Pres.	Aus.
	Amostra 3		Aus.	Pres.	Aus.
	Amostra 4		Aus.	Pres.	Aus.
Feira do Buritizal	Amostra 1		Aus.	Pres.	Aus.
	Amostra 2		Aus.	Pres.	Aus.
	Amostra 3		Aus.	Pres.	Aus.
	Amostra 4		Aus.	Pres.	Aus.
Feira do P. Socorro	Amostra 1		Aus.	Pres.	Aus.
	Amostra 2		Aus.	Pres.	Aus.
	Amostra 3		Pres.*	Pres.	Aus.
	Amostra 4		Aus.	Pres.	Aus.

*Necessita de confirmação sorológica **Fonte:** Autoria própria (2023)

Os resultados obtidos neste estudo revelam crescimento bacteriano em todas as amostras coletadas. As bactérias do gênero *E. coli* foram recuperadas em todas as amostras deste estudo em meio suplementado com antimicrobiano, o que demonstra que as bactérias que estão presentes no ecossistema já possuem características de resistência para a droga empregada.

5.2.1 *Salmonella* spp.

A legislação brasileira recomenda a ausência de *Salmonella* spp. em leites e derivados, devido seu potencial de gerar infecções de origem alimentar, quando detectada a presença desta bactéria o mesmo é rotulado como impróprio para consumo e comercialização (BRASIL, 2019).

Colônias suspeitas foram isoladas e submetidas aos testes bioquímicos, apresentaram no meio SIM produção de H₂S e motilidade, o resultado para o indol foi negativo, houve a descarboxilação do aminoácido lisina apresentando então um resultado positivo, no meio citrato pode-se observar que o isolado utilizou o citrato como única fonte de carbono e houve a descarboxilação dos aminoácidos ornitina.

Desta forma estas colônias suspeitas evidenciam a presença de *Salmonella* spp.

5.2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são responsáveis pela maior parte das infecções alimentares estafilocócicas, isso se dá pela capacidade desse microrganismo de produzir enterotoxinas termoestáveis que conseguem suportar a etapa de pasteurização do leite e de fabricação do queijo. Desta forma quando não passam por um processo adequado de esterilização continuam a produzir enterotoxinas causando malefícios a saúde (GOMES, 1995).

A partir das amostras coletadas não foi possível detectar nenhuma colônia desse gênero, porém as toxinas geradas, por apresentarem capacidade de suportar grandes temperaturas, podem muitas das vezes permanecer no alimento, mesmo após a ausência da bactéria, podendo causar intoxicações alimentares aos consumidores (SENGER et al., 2011).

5.2.3 *Escherichia coli*

De acordo com o Anexo I da instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, a presença da bactéria *E.coli* é autorizada até um determinado limite nos queijos, uma vez que são indicadores úteis de higiene e de contaminação pós processamento de alimentos processados. Sua presença em números elevados ($> 10^4$ UFC por grama) em alimentos prontos para consumo indica nível inaceitável de contaminação ou subprocessamento (por exemplo, cozimento inadequado) (FRAZÃO et al., 2021).

Tem crescido no decorrer dos anos relatos da resistência a antibióticos relacionadas a este gênero, principalmente quinolonas e betalactâmicos, devido à sua capacidade de transferir genes para outras bactérias, fator que contribui para a disseminação da resistência bacteriana (LIMA et al., 2022).

Desta forma, por mais que seja permitida a presença de determinado limite destas bactérias nos alimentos, as bactérias que adquirem a resistência a antibióticos implicam em um grande problema de saúde pública e divergem das premissas dentro do contexto da Saúde Única, uma vez que são consumidas, e por meio das fezes vão parar novamente no ecossistema, podendo estar presente nas águas, solo, e ainda serem consumidas por animais, tornando o tratamento e controle cada vez mais caro e difícil, além do aumento de casos de infecções hospitalares causados por bactérias resistentes (RODRIGUES et al., 2018; SILVA et al., 2018).

Os testes bioquímicos realizados com colônias suspeitas de *E.coli* apresentaram a descarboxilação do aminoácido lisina e ornitina, indol positivo, sem produção de H₂S, sendo necessários mais testes bioquímicos para confirmação fenotípica.

A legislação institui que o queijo tenha um número de colônias menor que 10², para estar dentro da qualidade aceita. As amostras coletadas apresentaram incontáveis colônias características de *E. coli* que cresceram em meio acrescido com Ceftriaxona, apontando a qualidade inadequada para consumo, além de apresentar um risco para os consumidores devido à resistência a essa cefalosporina (BRASIL, 2019).

5.3 MÉTODO DISCO-DIFUSÃO

Neste estudo foi possível recuperar 12 estirpes de *E. coli* selecionadas a partir do crescimento em ágar chromocult suplementado com 2µg/ml de ceftriaxona, esta droga quando utilizada no cultivo inicial seleciona isolados resistentes aos beta-lactâmicos, uma vez que a produção de betalactamases é o principal mecanismo de resistência a beta-lactâmicos em bactérias Gram-negativas. Destes 12 isolados 4 apresentaram resistência a Cefepima e duas à Azitromicina (Tabela 2) (VASCONCELOS et al., 2017).

Tabela 2. Resultados do teste de sensibilidade frente aos antimicrobianos de estirpes de *E.coli* isoladas de queijos comercializados na zona metropolitana de Macapá.

Microrganismo	CLASSE Agentes Antimicrobianos											
	IMP		GEN		LVX		TET		FEP		AZI	
	BrCast*											
	Halo (mm)	Perfil	Halo (mm)	Perfil	Halo (mm)	Perfil	Halo (mm)	Perfil	Halo (mm)	Perfil	Halo (mm)	Perfil
<i>E.coli</i> 1	34	S	19	S	27	S	20	S	18	R	26	S
<i>E.coli</i> 2	35	S	27	S	33	S	20	S	28	S	24	S
<i>E.coli</i> 3	32	S	20	S	28	S	20	S	20	R	29	S

<i>E.coli</i> 4	25	S	23	S	29	S	10	R	28	S	21	S
<i>E.coli</i> 5	27	S	24	S	40	S	24	S	30	S	-	R
<i>E.coli</i> 6	28	S	24	S	30	S	21	S	30	S	24	S
<i>E.coli</i> 7	28	S	25	S	27	S	21	S	28	S	22	S
<i>E.coli</i> 8	32	S	21	S	24	S	15	S	18	R	25	S
<i>E.coli</i> 9	26	S	24	S	26	S	20	S	23	R	23	S
<i>E.coli</i> 10	25	S	22	S	39	S	20	S	28	S	13	R
<i>E.coli</i> 11	20	I	21	S	31	S	16	S	25	I	28	S
<i>E.coli</i> 12	20	I	20	S	26	S	-	R	26	I	15	S

IMP –imipenem, AZI –azitromicina, GEN –gentamicina, LVX-Levofloxacino, TET-Tetraciclina, FEP-Cefepima. R: Resistente,I: Intermediário,S: Sensível.*BrCast, 2023.

Os resultados retrataram a resistência aos antimicrobianos existentes nos isolados dos queijos artesanais do Estado do Amapá. Considerando a presença da ceftriaxona no meio de isolamento consideramos que todos os isolados deste estudo são resistentes a esta droga na concentração de 2µg/ml, o que representa 100% das amostras coletadas. Diversos estudos, destacam a presença de *E. coli* em queijos coalho e queijos do tipo manteiga (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2012), nestes estudo essa bactéria apresentou resistência aos antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos como Imipenem, Ampicilina e Cefalotina. Melo et al. (2022) avaliaram esta espécie em queijos servidos em um hospital oncológico apresentando resistência a Tetraciclina e Gentamicina.

As colônias *E. coli* isoladas por este estudo apontaram uma resistência aos antibióticos Cefepima e Tetraciclina nas amostras de queijo pesquisadas, constatando a presença de estirpes com resistência às drogas hospitalares empregadas na linha de frente em infecções do trato urinário (ITUs) .

Desta forma a apuração da presença destes microrganismos nos queijos demonstra uma ameaça à saúde pública por contribuir com a propagação destas estirpes se tornando um problema de saúde única, desestabilizando o meio ambiente e fazendo com que ocorra investigação por mais escolhas terapêuticas eficazes (ARAUJO; QUEIROZ, 2012).

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram a circulação de *E. coli* e *Salmonella* spp. em queijos comercializados na zona metropolitana de Macapá, estes achados abrem a necessidade de maiores estudos quanto à origem destas bactérias, quantificando e qualificando a presença dentro dos parâmetros da legislação, possibilitando a investigação da produção e podendo averiguar possíveis falhas na sua cadeia produtiva.

Os isolados apresentaram diferentes perfis de resistência aos antimicrobianos, o que demonstra que sua presença no ecossistema pode contribuir com a disseminação da resistência entre os microrganismos, podendo ocasionar infecções de tratamento empírico comprometido e/ou de maior complexidade, dificultando o tratamento e aumentando os custos dos serviços de saúde.

Desta forma se faz necessário uma maior fiscalização somado a campanhas de uso racional de antimicrobianos, descarte adequado e vigilância adequada, levando a redução atendimentos e internações associadas a doenças transmitidas por alimentos que pode possuir bactérias com genes resistentes, visto que a pressão seletiva pode ter origem no descarte inadequado de antimicrobianos no meio ambiente, até o uso exclusivo de drogas que deveriam ser de uso humanos para tratar doenças em animais produtores de leite.

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria. **Microbiologyspectrum**, v. 5 e.d. 4, 2017.
- ARAÚJO, J. P. A.; CAMARGO, A.; CARVALHO, A. F.; NERO, L. A. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 1845-1860, 2020.
- ARAUJO, K. L.; QUEIROZ, A.C. Análise do perfil dos agentes causadores de infecção do trato urinário e dos pacientes portadores, atendidos no Hospital e Maternidade Metropolitano-SP. **J Health Sci Inst**, v. 30, n. 1, p. 7-12, 2012.
- AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos antibióticos beta-lactâmicos**. 2014. Tese de Doutorado. [sn].
- BRASIL, RDC N° 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. **Diário Oficial Da União**, Brasília, DF, 26 de dez. 2019.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.216, de 15\09\2004. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação Brasília, **Diário Oficial da União**, Brasília:2004
- BRASIL. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)**. Brasília: Ministerio da Saúde; 2019. 28 p.
- BOMFIM, A. P.; COSTA, D. B.; SILVA, I. M. N.; ARAÚJO, I. C. S.; ANDRADE, R. A.; GALVÃO, R. S.; CERQUEIRA, V. V.; REIS, J. N.; SANTOS, M. S. Qualidade microbiológica e caracterização da resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho comercializados em Vitória da Conquista-Bahia. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 27, p. e020015-e020015, 2020.
- BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C.; MACHADO, T. F. Salmonelose associada ao consumo de leite e produtos lácteos. **Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.
- BORGES, M. de F.; ARCUR, E. F.; PEREIRA, J. L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A. Y. Staphylococcus enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do centro de pesquisa de processamento de alimentos**, v. 26, n. 1, p. 70-86, 2008.
- CAMPOS, M. R. H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; VIEIRA, C. A. da S.; JAYME, L. B.; SANTOS, P. P.; SERAFINE, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de estirpes de Escherichia coli isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo" Minas Frescal" em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1221-1227, 2006.

CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* spp* Foodborne disease caused by *Salmonella* spp. **Rev Inst Ciênc Saúde**, v. 24, n. 2, p. 95-101, 2006.

COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DE ARRUDA, C. J. M. et al. **Revisão bibliográfica de antibióticos beta-lactâmicos**. 2019.

DIAS, B. F.; FERREIRA, S. M.; CARVALHO, V. S.; SOARES, D. S. B. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 3, p. 57-64, 2016.

DO AMARANTE, J. O. A. **Queijos do Brasil e do mundo para iniciantes e apreciadores**. Mescla Editorial, 2015.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; SANTOS G. C. F.; SOUZA, J. S.; BERNARDES, F. S.; SILVA, I. P. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, p. 55-67, 2016.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 162-165, 2003.

FERREIRA, R. M.; SPINI, J. C. M.; CARRAZZA, L. G.; SANT'ANA, D. S.; OLIVEIRA, M. T.; ALVES, L. R.; CARRAZZA, T. G. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal. **Pubvet**, v. 5, p. Art. 1019-1026, 2011.

FRAZÃO, G. F.; PORCY, C.; MOREIRA, N. de O.; LOPES, R. L.; MOREIRA, D. C.; MENEZES, R. A. de O.; BARBOSA, F. H. F. Qualidade microbiológica do queijo artesanal tipo "manteiga" comercializado em um município do Amapá. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 2, p. e5776-e5776, 2021.

GONZALES, E.; MELLO, H. H. C.; CAFÉ, M. B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, [S. l.], v. 13, n. 13, 2017. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/revistaufg/article/view/48453>. Acesso em: 23 de fev. de 2023.

GOMES, H. A. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas frescal, comercializados em Piracicaba-SP**. 1995. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

KÜMMERER K. Resistance in the environment. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 54, ed. 2, p. 311–320, 2004.

LIMA, J. F.; SANTOS, T. S. Aspectos econômicos e higiênico-sanitários da comercialização de camarões de água doce em feiras livres de Macapá e Santana, Estado do Amapá. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014. Disponível em: periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/685

LIMA, L.S.; PROIETTI-JUNIOR, A.A.; RODRIGUES, Y.C.; VIEIRA, M.C. S; Lima, L.N.G.C.; SOUZA, C. O.; GONÇALVES, V. D; LIMA, M. O; RODRIGUES, D. P.; LIMA, K.V.B. High Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Highlight *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae) as a Reservoir of Quinolone-Resistant Strains in Brazilian Amazon Rivers. **Microorganisms**, 2022. Disponível em: doi.org/10.3390/micro-organisms10040808 Academic Editor: Labrini V

LUZ, P. A.; SILVA, G.; ZANETTI, L. H.; VIEIRA, N. C.; ANDRIGHETTO, C. Qualidade física, química e microbiológica do queijo Minas Frescal produzido artesanalmente e por diferentes laticínios da região de Presidente Prudente. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 14, p. 1-8, 2022.

MACHADO, O. V.; PATROCÍNIO, M. C; MEDEIROS, M. S.; BANDEIRA, T. J. **Antimicrobianos: revisão geral para graduandos e generalistas**. Fortaleza: EdUnichristus, ed. 1, p. 452, 2019.

MARTINS, A. G.; FERREIRA, A. C. S. Caracterização das condições higiênico-sanitária das feiras livres da cidade de Macapá e Santana-AP. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v. 1, n. 1, p. 28-35, 2018.

MELO, F. M. et al. Resistência antimicrobiana da microbiota de queijos servidos em hospital oncológico do Rio de Janeiro-Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, p. e505111234837-e505111234837, 2022.

MERUSSI, G. D.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. P. L. M. SURTOS DE GASTROENTERITE RELACIONADOS AO CONSUMO DE LATICÍNIOS NO ESTADO DE SÃO PAULO NO PERÍODO DE 2000 A 2010 Outbreaks of gastroenteritis related to dairy products intake in the state of Sao Paulo from 2000 to 2010. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 23, n. 4, p. 646, 2013.

MORAIS, M. C. L. **Avaliação microbiológica de queijos de coalho comercializados em feira livre de município de pequeno porte da Paraíba**. 2019. 28 fl. (Trabalho de Conclusão de Curso – Monografia), Curso de Bacharelado em Nutrição, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – Paraíba – Brasil, 2019.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367, p. 19-25, 2009.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PIRES, B. A. D.; OLIVEIRA, J. W.S.; SILVA, C. R.; ABRANTES, S. M. P.; MARIN, V. A. Resistência antimicrobiana em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de queijo Minas Frescal no município do Rio de Janeiro—Perfil fenotípico e genotípico. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 7, n. 3, p. 86-91, 2019.

RODRIGUES, T. S.; SANTOS, A. M. R.; LIMA, P. C.; MOURA, M. E. B.; GOIANO, P. D. O. L.; FONTINELE, D. R. S. Resistência bacteriana a antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: revisão integrativa. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 4, 2018.

ROSA, J. L. R. L.; BARROS, R. F. B. F.; SANTOS, M. O. S. O. Características da *Escher-78, 2 ichia coli* enterohemorrágica (EHEC). **Saúde & Ciência em Ação**, v. 2, n. 1, p. 66016.

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. PESQUISA DE *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL, PRODUZIDO DE FORMA ARTESANAL E INDUSTRIAL, COMERCIALIZADO NA CIDADE DE CANOAS/RS, BRASIL. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 5, n. 2, p. 25-42, 2011.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. de C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & saúde coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, E. S. **Detecção de vírus entéricos, coliformes totais e escherichia coli em água de poços da cidade de Macapá-AP**. Orientador: Júlio César Sá de Oliveira; Coorientadora: Elza Caroline Alves Muller. 2019. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Departamento de Pós-Graduação, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2019. Disponível em: <http://repositorio.unifap.br:80/jspui/handle/123456789/111>. Acesso em: 17 fev 2023

SILVA, P. Fármacos antifúngicos. **Farmacologia**, 7th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p. 1072-1074, 2006.

SILVA, R. O. J. **Caracterização fenotípica de resistência antimicrobiana de *staphylococcus* spp. e termotolerantes isolados de queijos de coalho**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SILVA, G. J.; MENDONÇA, N. Association between antimicrobial resistance and Virulence in *Escherichia coli*. **Virulence**, v. 3, ed. 1, p. 18-28, 2012.

SOARES, D. B.; MONTEIRO, G. P.; FONSECA, B. B.; FREITAS, E. A.; MENDONÇA, E. P.; MELO, R. T.; IASBECK, J. R.; ROSSI, D. A. Análise sanitária e físico-química e adequação bacteriológica do queijo minas artesanais produzido em duas propriedades. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, 2018.

SOUZA, C. O.; MELO, T. R. B.; MELO, C. S. B.; MENEZES, E. M.; CARVALHO, A. C.; MONTEIRO, L. C. R. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016.

TOOKE, C. L.; HINCHLIFFE, P.; BRAGGINTON, E. C. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of molecular biology**, v. 43, ed.18, p. 3472-3500, 2019.

TURNER, K. M.; RESTAINO, L.; FRAMPTON, E. W. Efficacy of chromocult coliform agar for coliform and *Escherichia coli* detection in foods. **Journal of food protection**, v. 63, n. 4, p. 539-541, 2000.

VASCONCELOS, P. C. et al. Ocorrência de enterobactérias produtoras de beta lactamase de espectro ampliado (Esbl) em carcaças de frango comercializadas no estado da Paraíba. 2017.

VINHA, M. B.; PINTO, C. L. O.; SOUZA, M. R. M.; CHAVES, J. B. P. Fatores socioeconômicos da produção de queijo minas frescal em agroindústrias familiares de Viçosa, MG. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2023-2029, 2010.

VIROLLE, C.; GOLDLUST, K.; DJERMOUN, S. Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. **Genes**, v. 11, e. 11, n. 1239, 2020.

XAVIER, E. P. **Análise de rotulagem de queijos artesanais comercializados em um empório em Goiânia**. 2020.

ANEXO I – FEIRA DO PRODUTOR

HIGIENE	SIM	NÃO	OBSERVAÇÃO
Presença de lixeira no local	X		
Limpeza do lugar de venda		X	Não foi possível averiguar uma limpeza de bancadas antes da exposição do alimento
Uso de utensílios domésticos	X		
Pia com água corrente para a higienização		X	
Prateleira		X	
Armazenamento dos alimentos adequados		X	Os queijos se encontravam em temperatura ambiente e expostos em todo período de venda
COMERCIANTE	SIM	NÃO	OBSERVAÇÃO
Utilizavam toucas e/ou luvas		X	
Homens com barba	X		
Mulheres com cabelos longos	X		Os cabelos longos ficavam presos

Unhas limpas e curtas		X	
Uso de acessórios		X	
QUEJO	SIM	NÃO	OBSERVAÇÃO
Contém embalagem		X	Alimentos não apresentavam uma embalagem individual
O contato com o alimento ocorre diretamente com as mãos	X		
Exposição ao sol	X		
Presença de animais próximo ao alimento	X		
Contato com o dinheiro e em seguida com o alimento	X		

Fonte: AMANAJÁS, 2022 (Modificado)

ANEXO II – FEIRA DE SANTANA

HIGIENE	SIM	NÃO	OBSERVAÇÃO
Presença de lixeira no local	X		
Limpeza do lugar de venda		X	Não foi possível averiguar uma limpeza de bancadas antes da exposição do alimento
Uso de utensílios domésticos	X		Utilização de facas de cozinha para corte dos queijos
Pia com água corrente para a higienização		X	

Prateleira		X	
Armazenamento dos alimentos adequados		X	Os queijos se encontravam em temperatura ambiente e expostos em todo período de venda
COMERCIANTE	SIM	NÃO	OBSERVAÇÃO
Utilizavam toucas e/ou luvas	X		Somente um produtor utilizava touca no momento da venda
Homens com barba	X		
Mulheres com cabelos longos	X		Os cabelos longos ficavam presos
Unhas limpas e curtas		X	
Uso de acessórios		X	
QUEJO	SIM	NÃO	OBSERVAÇÃO
Contém embalagem		X	Alimentos não apresentavam uma embalagem individual
O contato com o alimento ocorre diretamente com as mãos	X		
Exposição ao sol	X		
Presença de animais próximo ao alimento	X		
Contato com o dinheiro e em seguida com o alimento	X		

Fonte: AMANAJÁS, 2022 (Modificado)

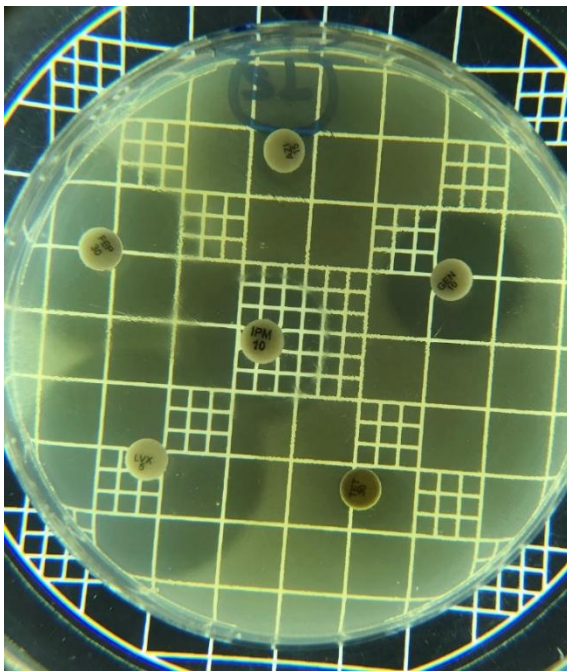
ANEXO III – FEIRA DO PERPÉTUO SOCORRO

HIGIENE	SIM	NÃO	OBSERVAÇÃO
Presença de lixeira no local	X		
Limpeza do lugar de venda		X	Não foi possível averiguar uma limpeza de bancadas antes da exposição do alimento
Uso de utensílios domésticos	X		
Pia com água corrente para a higienização		X	
Prateleira		X	
Armazenamento dos alimentos adequados		X	Os queijos se encontravam em temperatura ambiente e expostos em todo período de venda
COMERCIANTE	SIM	NÃO	OBSERVAÇÃO
Utilizavam toucas e/ou luvas		X	
Homens com barba	X		
Mulheres com cabelos longos	X		Os cabelos longos ficavam presos
Unhas limpas e curtas		X	
Uso de acessórios		x	
QUEJO	SIM	NÃO	OBSERVAÇÃO
Contém embalagem		X	Alimentos não apresentavam uma embalagem individual

O contato com o alimento ocorre diretamente com as mãos	X		
Exposição ao sol	X		
Presença de animais próximo ao alimento	X		
Contato com o dinheiro e em seguida com o alimento	X		

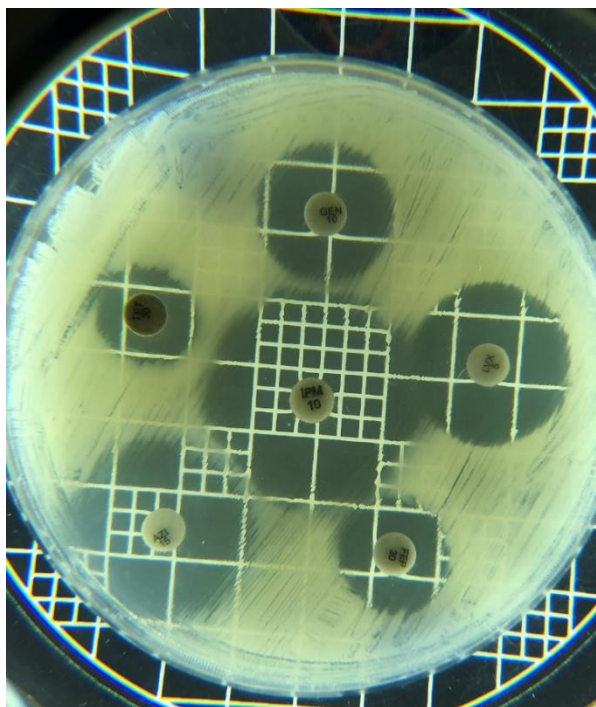
Fonte: AMANAJÁS, 2022 (Modificado)

ANEXO VI – Amostra 12



Fonte: Autoria própria (2023)

ANEXO V – Amostra 8



Fonte: Autoria própria (2023)