



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Lúcia Mara dos Reis Lemos

**PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E LEVANTAMENTO DO CONHECIMENTO DE
ESTUDANTES SOBRE MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE
PATÓGENOS EM ALIMENTOS**

Florianópolis
2024

Lúcia Mara dos Reis Lemos

**PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E LEVANTAMENTO DO CONHECIMENTO
ACADÊMICO SOBRE MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE
PATÓGENOS EM ALIMENTOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências dos Alimentos da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito
parcial para obtenção do título de Doutora em
Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Carolina
Maisonnave Arisi

Florianópolis

2024

Ficha de identificação da obra

Lemos, Lúcia Mara dos Reis

Prospecção científica e levantamento do conhecimento acadêmico sobre métodos moleculares para detecção de patógenos em alimentos / Lúcia Mara dos Reis Lemos ; orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi, 2024.

154 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Patógenos em alimentos. 3. Prospecção científica. 4. Questionário online. 5. PMA-qPCR. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Lúcia Mara dos Reis Lemos

**Prospecção científica e levantamento do conhecimento acadêmico sobre métodos
moleculares para detecção de patógenos em alimentos**

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

Profa. Dra. Daniele Fernanda Maffei
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Jeverson Frazzon
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Marília Miotto
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi
Orientadora

Florianópolis, 2024.

À minha querida família e aos meus amados pais,
Maria Lúcia e Francisco, cujo apoio e amor
incansáveis permitiram que eu chegasse até aqui.
A vocês, que sempre acreditaram em mim,
dedico a conquista deste título.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que é o Princípio, Meio e o Fim, que me sustentou com Seu amor e graça. Sua presença nunca me faltou. E a Nossa Senhora por sua constante proteção.

Aos meus queridos pais, Maria Lúcia e Francisco, que estiveram ao meu lado desde o início da minha jornada acadêmica, quando escrevia as primeiras linhas e soletrava as primeiras palavras. Vocês me guiaram pelo caminho dos estudos, me educaram e moldaram a pessoa que sou hoje. A filha de dois agricultores, e de origem humilde, conseguiu o tão sonhado doutorado.

Às minhas queridas irmãs Izaura e Eugênia, vocês são fontes de inspiração para mim, e eu amo vocês por tudo que fazem por mim. Aos meus irmãos Edson, Francisco Neto, Everardo, Ednaldo e Hélio (em memória), assim como suas famílias, por todo incentivo durante esta jornada.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela orientação precisa e pelo constante direcionamento ao longo de todo doutorado. Sua experiência foi fundamental para o sucesso desta pesquisa. Quero expressar minha gratidão pela confiança em meu trabalho e pelos inestimáveis ensinamentos que recebi.

À professora Dra. Isabela Maia Toaldo Fedrigo, cujas palavras de incentivo e contribuições durante esta jornada foram importantes.

Ao Dr. Jeverson Frazzon por aceitar o convite para ser o relator da tese e membro da banca examinadora, bem como pelas valiosas contribuições que proporcionou.

À banca examinadora, Dra. Daniele Fernanda Maffei e à Dra. Marília Miotto pelos importantes feedbacks que ajudaram a aprimorar este trabalho. Suas observações foram essenciais para a qualidade final da pesquisa

À Edilene e à Natália, expresse meu agradecimento por compartilharem a moradia em Florianópolis. A companhia de vocês e nossos desabafos diários nesta jornada de doutorado foram essenciais neste período longe de casa. Grata pela amizade; levarei isso comigo.

Ao meu querido, Willian, quero expressar minha gratidão por cuidar de mim nesta reta final, trazendo amor e carinho aos meus dias. Tudo ficou mais leve com você ao meu lado.

Às colegas Lorena, Deyonara, Elisandra, Tuany, Ana Marina, Bruna, Ana Gabriela e Joana, integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular, expresse minha gratidão pela troca diária e pela valiosa parceria. Agradecimento especial à querida Lorena Dutra, pelas nossas conversas e pela sua amizade.

Aos meus amigos e amigas e pessoas conhecidas da comunidade de Santa Catarina e do município de Quixeramobim-Ceará, que mesmo à distância, sempre estiveram torcendo por mim.

Ao Dr. Ivano de Filippis, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Instituto Oswaldo Cruz (CBRVS, INCQS, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ) por sua gentileza ao disponibilizar a cepa da bactéria para este estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido, que possibilitou a realização deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, expresso meu reconhecimento pelo ambiente acadêmico enriquecedor que proporcionaram.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Centro de Ciências Agrárias (CCA) pela estrutura e ambiente propícios à pesquisa e ao aprendizado.

Gratidão a todos!

Lúcia Lemos.

RESUMO

Os métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) são amplamente empregados em diversas áreas de pesquisa, inclusive na detecção de microrganismos patogênicos em alimentos. Corantes intercalantes de DNA acoplados à PCR quantitativa (qPCR) têm sido utilizados para distinguir células viáveis e não viáveis em matrizes complexas com população microbiana variada. Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram realizar um mapeamento de trabalhos, através de estudo prospectivo, sobre a utilização de corantes de viabilidade combinado ao método de qPCR (vPCR) na detecção de células viáveis de microrganismos patogênicos em alimentos e investigar o conhecimento sobre métodos baseados em PCR e patógenos transmitidos por alimentos entre estudantes e profissionais brasileiros de graduação e pós-graduação. Também foi realizado experimentos sobre o crescimento da bactéria *Cronobacter sakazakii* cepa P4777 em mingau à base de milho e fórmula infantil em pó (FIP) em diferentes temperaturas de armazenamento (4, 25 e 37°C). Foi utilizado PCR convencional, qPCR e contagem em placas em meio Luria Bertani (LB) ágar para verificar a multiplicação do patógeno. Em relação à prospecção científica realizada nas bases de dados *Scopus*, *Pubmed*, *Web of Science*, *Springer* e *Science Direct*, no período de 2010–2022, foi possível observar que muitos trabalhos publicados na literatura utilizaram moazida de propídio com qPCR (PMA-qPCR). Dos 441 documentos selecionados, 58 artigos científicos se referem a aplicação de PMA-qPCR na detecção de patógenos em alimentos. Os patógenos mais reportados nos trabalhos científicos foram *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* e *Cronobacter sakazakii*. O conhecimento acadêmico dos estudantes e profissionais brasileiros foi mensurado com a utilização de questionário online distribuído através de *e-mail* e redes sociais em todo território brasileiro. Entre os 1246 respondentes, 75,8% dos participantes responderam que conheciam algum patógeno veiculado por alimentos e 71,4% dos participantes responderam que não estudaram técnicas de biologia molecular durante a graduação. O maior nível de conhecimento foi encontrado entre os profissionais com mestrado e doutorado. No ensaio que investigou a multiplicação de *C. sakazakii*, os resultados da contagem em meio LB destacaram um crescimento mais expressivo a 37°C, após 24 e 48 horas. Em conclusão, destacamos as publicações sobre ensaios vPCR desenvolvidos para detecção de patógenos em alimentos. Em relação ao conhecimento acadêmico, identificamos lacunas no conhecimento sobre técnicas moleculares, como PCR e qPCR, para detecção de patógenos em alimentos entre estudantes e profissionais brasileiros. Além disso, verificamos a multiplicação de *C. sakazakii* em alimentos destinados a crianças da primeira infância em diferentes temperaturas de armazenamento.

Palavras-chave: DTHA; Estudantes; Patógenos; Prospecção; Questionário online; qPCR; vPCR; PMA-qPCR.

ABSTRACT

Molecular methods based on the polymerase chain reaction (PCR) are widely used in several research areas, including foodborne pathogens detection. DNA-intercalating dyes coupled with quantitative PCR (qPCR) have been used to distinguish viable and non-viable cells in complex matrices with varying microbial populations. In this context, the aims of this study were to map published assays using viability dyes combined with qPCR (vPCR), to detect viable cells of foodborne pathogens and to investigate the knowledge about PCR-based methods and foodborne pathogens among undergraduate and graduate Brazilian students and professionals. Experiments were also conducted on the growth of the bacterium *Cronobacter sakazakii* strain P4777 in cornmeal porridge and powdered infant formula (PIF) at different storage temperatures (4, 25, and 37°C). Conventional PCR, qPCR, and plate count on Luria Bertani (LB) agar medium were employed to assess the multiplication of the pathogen. Concerning the prospective review, studies in the period 2010–2022 were identified in Scopus, PubMed, Web of Science, Springer, and Science Direct databases. When using the search terms ("viability dyes" OR "PMA") AND "quantitative PCR" AND "Foodborne pathogens", 441 documents were found, of which 288 scientific articles, 58 articles refer to the vPCR use for foodborne pathogens detection. Scientific papers on vPCR assays primarily target the following foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, and *Cronobacter sakazakii*. The knowledge about PCR-based methods and foodborne pathogens among undergraduate and graduate Brazilian students and professionals was assessed using an online questionnaire distributed via email and social networks throughout Brazil. Data from 1246 respondents was collected. The knowledge scores were verified by correspondence analysis and discussed, 75.8% of the participants answered that they knew a foodborne pathogen and 71.4% of the participants answered that they did not study molecular biology techniques during undergraduate course. The highest level of knowledge was found among professionals with Masters' and PhD degrees. In the assay investigating the multiplication of *C. sakazakii*, the results of the plate count in LB medium highlighted more pronounced growth at 37°C after 24 and 48 hours. In conclusion, we emphasize publications on vPCR assays developed for pathogen detection in food. Concerning academic knowledge, we identified gaps in understanding molecular techniques, such as PCR and qPCR, for pathogen detection in food among Brazilian students and professionals. Additionally, we observed the multiplication of *C. sakazakii* in foods intended for infants at different storage temperatures.

Keywords: Foodborne diseases; Students; Foodborne pathogens; Online questionnaire; Prospection; qPCR; vPCR; PMA-qPCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

ddPCR PCR digital

DTHA Doenças de transmissão hídrica e alimentar

EMA Etídio de monoazida

FAO Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

IAC Controle de amplificação interna

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISCP Controle interno do processo de amostragem

OMS Organização Mundial de Saúde

PMA Propídio de monoazida

PMAxxTM Corante de viabilidade (Biotium)

PEMAXTM: Corante de viabilidade (GenIUL)

qRPA Amplificação quantitativa da recombinase polimerase

SD Deoxicolato de sódio

SDS Dodecilsulfato de sódio

SDO Desoxicolato de sódio

SINAN Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VBNC Células viáveis, mas não cultiváveis

vPCR Corantes de viabilidade combinados com o método qPCR

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1 – Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados nos surtos de doenças de origem hídrica e alimentar no Brasil, 2013 a 2022.....24
- Figura 1.2 – Passos da reação em cadeia da polimerase.26
- Figura 1.3 – Comparação de métodos microbiológicos convencionais e qPCR para a quantificação de microrganismos em amostras de alimentos.....27
- Figura 1.4 – Descrição representativa da reação de células viáveis e não viáveis com corantes de viabilidade em conjunto com a técnica qPCR.29

Capítulo 2

- Figura 2.1 – Evolução anual das publicações sobre a utilização de corantes intercalantes de DNA com a técnica de PCR quantitativa.50
- Figura 2.2 – Origem geográfica dos documentos encontrados.51
- Figura 2.3 – Porcentagem de categorias de publicações na fase de identificação nas bases de dados Scopus, Science Direct, Web of Science, PubMed e Springer.52
- Figura 2.4 – Número de publicações sobre o uso de corantes intercalantes de DNA com ensaios quantitativos de PCR por periódicos selecionados nas bases de dados Scopus, Science Direct, Web of Science, PubMed e Springer.....53
- Figura 2.5 – Palavras-chave de publicações sobre o uso de corantes intercalantes de DNA com os ensaios quantitativos de PCR pesquisados nas bases de dados Scopus, Science Direct, Web of Science, PubMed e Springer.54
- Figura 2.6 – Principais microrganismos patogênicos investigados e frequência de ocorrência em publicações selecionadas sobre o uso de corantes intercalantes de DNA com os ensaios quantitativos de PCR.56

Capítulo 3

- Figura 3.1– Número de respostas por estados brasileiros.75
- Figura 3.2 – Número de respostas dos cursos de ensino superior no Brasil.78
- Figura 3.3– Microrganismos de origem alimentar mais citados pelos brasileiros profissionais, alunos de graduação e pós-graduação.80
- Figura 3.4 – Análise de correspondência das pontuações de perguntas de conhecimento (satisfatório/insatisfatório) de estudantes brasileiros e profissionais do ensino superior sobre técnicas baseadas em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar, considerando a demografia dos participantes e suas características.....87

Capítulo 4

Figura 4.1 – Perfil de crescimento da cepa P4777 <i>Cronobacter sakazakii</i> em meio BHI a 37°C por oito horas.	102
Figura 4.2 – PCR convencional da cepa original P4777 e de colônias de <i>C. sakazakii</i> com amplificação do fragmento de 514 pb do gene <i>rpoB</i> . Gel de agarose 1,5%. Canaletas: 1. Ladder 1 kb; 2. vazio; 3. Água; 4. Controle negativo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922; 5-6. P4777 <i>C. sakazakii</i> ; 7. vazio; 8-10. Colônias isoladas em LB ágar de <i>C. sakazakii</i> ;	103
Figura 4.3 – Curvas padrão do ensaio qPCR para <i>Cronobacter sakazakii</i> utilizando iniciadores Crono F/R (Cq versus log cópias de DNA genômico).	106

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1 – Diferentes alimentos e ambientes onde espécies de *Cronobacter* foram registradas em diversos países. 38

Capítulo 2

Tabela 2.1 – Escopo da estratégia de busca e número de documentos encontrados em cada banco de dado sobre corantes intercalantes de DNA acoplados a ensaios de qPCR para detecção de células viáveis do patógeno. 48

Tabela 2.2 – Artigos selecionados sobre corantes intercalantes de DNA acoplados a ensaios de qPCR para detecção de células viáveis de patógenos em diferentes matrizes alimentares. 57

Capítulo 3

Tabela 3.1 – Características (gênero, idade e educação) dos profissionais, estudantes de graduação e pós-graduação no Brasil. 77

Tabela 3.2 – Frequência e percentual de respostas sobre questões de microbiologia, intoxicação alimentar e patógenos de origem alimentar de estudantes e profissionais no Brasil. 79

Tabela 3.3 – Número e porcentagem de respostas sobre técnicas de biologia molecular e reação em cadeia da polimerase (PCR) de profissionais e estudantes no Brasil. 81

Tabela 3.4 – Pontuação de avaliação de conhecimento de detecção de patógenos de origem alimentar usando técnicas baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR). 82

Tabela 3.5 – Associação entre características demográficas e total conhecimento (satisfatório/insatisfatório) sobre patógenos transmitidos por alimentos e à base de reação em cadeia da polimerase (PCR) técnicas de estudantes brasileiros e profissionais com ensino superior. 85

Capítulo 4

Tabela 4.1 – Contagem em meio LB ágar das amostras controle (não inoculadas com *C. sakazakii*) de fórmula infantil e mingau à base de milho armazenadas por 48 h em temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C. 104

Tabela 4.2 – Contagem em meio LB ágar de amostras de fórmula infantil e mingau à base de milho inoculadas com *C. sakazakii* cepa P4777 e armazenadas por 48 h em temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C. 105

Tabela 4.3 – Resultados da PCR convencional usando iniciadores *Csakf*, que amplificam o fragmento de 514 pb do gene *rpoB*, das amostras controle (não inoculadas) de fórmula infantil e mingau à base de milho e das amostras de fórmula infantil e mingau à base de milho

inoculadas com *C. sakazakii* cepa P4777 e armazenadas por 48 h em temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C. 108

Tabela 4.4 – Resultado de detecção por PCR convencional usando iniciadores *Csakf*, que amplificam o fragmento de 514 pb do gene *rpoB*, das amostras da curva padrão de diluição seriada de DNA de *C. sakazakii*. 109

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.2 OBJETIVOS.....	20
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO 1	21
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1 SEGURANÇA DE ALIMENTOS.....	22
2 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS EM ALIMENTOS.....	24
2.1 MÉTODOS MOLECULARES BASEADOS EM PCR.....	25
2.2 USO DE CORANTES INTERCALANTES DE DNA NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS E NÃO VIÁVEIS ACOPLADO A qPCR.....	28
2.3 REVISÃO DE LITERATURA E PROSPECÇÃO CIENTÍFICA SOBRE v-PCR	29
3 CONHECIMENTO SOBRE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA A DETECÇÃO DE PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR	31
3.1 USO DE QUESTIONÁRIOS COMO FERRAMENTA DE COLETA EM PESQUISAS NA ÁREA DE SEGURANÇA DE ALIMENTOS	31
3.2 CONHECIMENTO SOBRE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS E ÁGUA.....	32
3.3 CONHECIMENTO SOBRE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR BASEADAS EM PCR.....	34
3 GÊNERO <i>CRONOBACTER</i> E OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES.....	36
3.1 OCORRÊNCIA DE <i>CRONOBACTER</i> SPP. EM ALIMENTOS.....	38
3.2 CRESCIMENTO DE <i>CRONOBACTER</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	41
CAPÍTULO 2	44
1 INTRODUÇÃO	46
2 IMPACTO DA PROSPECÇÃO DE ENSAIOS DE VIABILIDADE qPCR NA DETECÇÃO DE PATOGÊNIOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS.....	47

2.1 FONTES DE INFORMAÇÃO E PESQUISA SOBRE ENSAIOS DE VIABILIDADE DE CORANTES- qPCR	47
3 REVISÃO GERAL DOS ENSAIOS DE VIABILIDADE DYES-qPCR.....	49
4 DESAFIOS PARA DETECÇÃO DE PATOGÊNOS ALIMENTARES POR ENSAIOS DE vPCR	67
5 CONCLUSÃO.....	68
CAPÍTULO 3	69
1 INTRODUÇÃO	71
2 MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1 PROJETO DE ESTUDO	73
2.2 QUESTIONÁRIO	73
2.3 COLETA DE DADOS	74
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1 CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES	75
3.2 CONHECIMENTO GERAL SOBRE PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR	78
3.3 CONHECIMENTO SOBRE MÉTODOS BASEADOS EM PCR	80
3.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE CONHECIMENTOS DOS PARTICIPANTES SOBRE DETECÇÃO DE PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR POR TÉCNICAS BASEADAS EM PCR.....	84
3.5 DISCUSSÃO	87
4 CONCLUSÃO.....	93
CAPÍTULO 4	94
1 INTRODUÇÃO	96
2 MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1 PREPARAÇÃO DA CULTURA DE <i>C. SAKAZAKII</i>	98
2.2 PREPARO DA FÓRMULA INFANTIL E MINGAU À BASE DE AMIDO DE MILHO	

2.3 ENUMERAÇÃO DE <i>C. SAKAZAKII</i> EM MEIO DE CULTIVO POR CONTAGEM EM PLACA.....	99
2.4 EXTRAÇÃO DE DNA DA CULTURA BACTERIANA.....	99
2.5 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	99
2.6 PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE <i>C. SAKAZAKII</i>	100
2.7 QPCR PARA <i>C. SAKAZAKII</i>	100
2.8 CONSTRUÇÃO DE CURVAS PADRÃO PARA qPCR.....	101
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	101
3 RESULTADOS.....	101
3.1 CRESCIMENTO DA CULTURA DE <i>C. SAKAZAKII</i>	102
3.2 PCR CONVENCIONAL DA CULTURA BACTERIANA.....	102
3.3 CRESCIMENTO DE <i>C. SAKAZAKII</i> EM FÓRMULA INFANTIL E MINGAU.....	103
3.3.1 CONTAGEM EM PLACAS EM MEIO LB ÁGAR.....	103
3.3.2 ENSAIO DE qPCR.....	106
4 DISCUSSÃO.....	109
5 CONCLUSÃO.....	112
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
REFERÊNCIAS.....	114
APÊNDICE A –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- TCLE	
134	
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO ONLINE.....	139
ANEXO A – PÁGINA INICIAL DO ARTIGO “VIABILITY DYES QUANTITATIVE PCR (VPCR) ASSAYS TARGETING FOODBORNE PATHOGENS - SCIENTIFIC PROSPECTING (2010–2022)”.....	147
ANEXO B – PÁGINA INICIAL DO ARTIGO “KNOWLEDGE ABOUT FOODBORNE PATHOGENS AND PCR-BASED MICROBIAL DETECTION METHODS AMONG BRAZILIAN STUDENTS AND PROFESSIONALS: A SURVEY”.....	148
ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC).....	149

1 INTRODUÇÃO

As doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) representam desafios prementes para a saúde pública global, sendo a natureza infecciosa ou tóxica dessas enfermidades frequentemente associada a uma variedade de microrganismos presentes nos alimentos. Dentre eles, bactérias e vírus patogênicos destacam-se como os principais causadores de surtos de DTHA em todo o mundo, afetando milhões de pessoas anualmente. Exemplos notáveis incluem *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. e *Campylobacter*, identificados como principais protagonistas desses eventos (Brasil 2023a, 2023b; CDC, 2023a; EFSA, 2023, OMS, 2015).

Com o crescente enfoque na segurança de alimentos, a pesquisa de métodos de detecção de patógenos em alimentos tem experimentado avanços substanciais. A literatura científica oferece uma gama diversificada de técnicas moleculares específicas para diferentes microrganismos patogênicos e matrizes alimentares (Elizaquível; Aznar; Sánchez, 2014). Entre as abordagens de detecção rápida mais comuns, destacam-se as técnicas moleculares baseadas na sequência de ácidos nucleicos, como reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR). Embora os métodos baseados em PCR se destaquem, ao proporcionar especificidade, sensibilidade e eficiência (Hameed; Xie; Ying, 2018), enfrentam desafios em comprovar consistentemente a viabilidade celular (Foddai; Grant, 2020). Para superar essas limitações, a utilização de corantes intercalantes de DNA, associados a corantes de viabilidade como etídio de monoazida (EMA) e propídio de monoazida (PMA), aliados à qPCR, conhecidos como PCR de viabilidade (vPCR), têm permitido a quantificação específica de células viáveis (Nocker; Cheung; Camper, 2006; Zeng et al., 2016). Contudo, até o momento, não foram documentados estudos prospectivos que abordem a utilização desses corantes em ensaios moleculares baseados em PCR para a detecção de patógenos de origem alimentar. A condução de uma pesquisa prospectiva nesse contexto revela-se essencial, proporcionando uma contribuição única e complementar às revisões de literatura já existentes.

No âmbito dos métodos moleculares, amplamente empregados em laboratórios de análise, a literatura científica destaca o constante desenvolvimento e aprimoramento dessas técnicas. No campo da ciência dos alimentos, pesquisas têm sido conduzidas para a detecção de espécies causadoras de DTHA em diversas matrizes alimentares (Carvalho *et al.* 2020; Faille *et al.* 2020; Ling *et al.*, 2020; ; Randazzo *et al.*, 2017). Contudo, à medida que os métodos moleculares ganham destaque nos laboratórios e na literatura científica, evidencia-se a necessidade de familiarizar estudantes e profissionais com essas tecnologias. Tal necessidade é

corroborada por estudos que apontam para percepções diversas da população em relação a novas tecnologias, especialmente no que tange à biotecnologia e biologia molecular (Chen *et al.*, 2016; Couch; Wood; Knight, 2015; Shi *et al.*, 2010; Southard *et al.*, 2016; Uhl *et al.*, 2021).

À medida que avançamos para compreender os caminhos de infecção alimentar e a sobrevivência de patógenos em alimentos, observa-se um crescente interesse na pesquisa científica. Entre os patógenos emergentes, destaca-se a bactéria *Cronobacter sakazakii*, incorporada à legislação brasileira de controle microbiológico de alimentos devido às infecções em neonatos associadas ao consumo de fórmulas infantis e alimentos desidratados. (Osali *et al.*, 2009; Warnken *et al.*, 2012; Brandão *et al.*, 2016; Brandão *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019; Brasil, 2022b). Entretanto, é crucial reconhecer que, mesmo com os avanços científicos, a falta de conhecimento da população sobre patógenos frequentemente resulta em comportamentos que comprometem a segurança de alimentos. Em particular, a não aderência às instruções do fabricante, como não seguir o tempo de cocção e a temperatura adequada durante o preparo, emerge como uma preocupação recorrente. Nesse contexto, a disseminação eficaz de informações claras sobre a segurança de alimentos torna-se essencial.

Desta forma, esta tese possui a seguinte estruturação: O Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica destacando conceitos fundamentais sobre segurança de alimentos, bem como as principais técnicas moleculares usadas na detecção e quantificação de patógenos em alimentos. O Capítulo 2 explora cientificamente o mapeamento de corantes de viabilidade acoplados à qPCR (vPCR) de microrganismos envolvidos em DTHA. O Capítulo 3 aborda o levantamento online por meio de questionário, sobre o conhecimento de estudantes e profissionais brasileiros com ensino superior sobre patógenos em alimentos e métodos baseados em PCR. O Capítulo 4 aborda o estudo sobre a multiplicação de *Cronobacter sakazakii* e sua detecção por PCR em fórmula infantil em pó e mingau a base de milho.

Vale ressaltar que os capítulos 2 e 3 foram desenvolvidos durante um período marcado pela pandemia de COVID-19. A crise global desencadeada por essa pandemia impactou profundamente a rotina acadêmica e as atividades laboratoriais em todo o mundo. Diante das restrições de acesso a laboratórios e à coleta presencial de dados, a abordagem metodológica precisou ser adaptada para permitir a continuidade da pesquisa. Essa nova dinâmica influenciou a forma como exploramos a detecção de patógenos em alimentos por vPCR (Capítulo 2) e a avaliação do conhecimento de estudantes e profissionais sobre patógenos e métodos moleculares (Capítulo 3). Portanto, a pandemia de COVID-19 não apenas ilustra os desafios enfrentados na realização deste estudo, mas também realça a relevância da pesquisa científica em segurança de alimentos, especialmente em tempos de crise global.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Realizar um levantamento de prospecção científica e investigar o conhecimento atual de estudantes e profissionais brasileiros sobre os métodos moleculares aplicados à detecção de patógenos em alimentos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Conduzir um levantamento de trabalhos por meio de prospecção científica, destacando conhecimentos prévios sobre o uso de corantes intercalantes de DNA, com ênfase no corante PMA, em conjunto com qPCR, para a detecção da viabilidade celular de patógenos em alimentos;
- Avaliar o conhecimento de estudantes de graduação e pós-graduação e profissionais no Brasil, por meio de um questionário online, sobre patógenos em alimentos e os métodos baseados em PCR para sua detecção;
- Verificar a multiplicação de *Cronobacter sakazakii* em mingau à base de amido de milho em diferentes condições de temperatura.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 SEGURANÇA DE ALIMENTOS

A segurança de alimentos é uma preocupação constante para consumidores, indústria de alimentos e agências reguladoras uma vez que está diretamente relacionada à prevenção de doenças transmitidas por alimentos e água. As DTHA representam um grave problema de saúde pública global, causando casos graves de doenças na população, além de óbitos e grandes prejuízos financeiros (Bisht *et al.*, 2021; Saeed; Osaili; Taha, 2021). Garantir a segurança dos alimentos é essencial para evitar a ocorrência dessas doenças e proteger a saúde da população.

As DTHA são causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados por substâncias químicas, metais pesados, bactérias, vírus e parasitas. A ocorrência de um surto de DTHA pode ocorrer de forma isolada, como no caso de intoxicação causada pelo *Clostridium botulinum*. Por outro lado, também é possível observar surtos quando duas ou mais pessoas manifestam sintomas após ingerirem alimentos ou água contaminados provenientes do mesmo local, fabricante ou origem (Brasil, 2023b). A ação dos patógenos pode ocorrer por meio de infecções, toxinfecções e intoxicações alimentares. As infecções são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por agentes infecciosos, como vírus, fungos, bactérias e parasitas, que podem se multiplicar, produzir toxinas, aderir ou invadir a parede intestinal, podendo alcançar outros órgãos ou sistemas do corpo. Nas toxinfecções alimentares, a doença é desencadeada pela ingestão de bactérias patogênicas capazes de produzir toxinas que causam danos ao organismo. Por outro lado, as intoxicações são provocadas pelo consumo de toxinas formadas devido à proliferação intensa do agente patogênico no alimento (Brasil, 2010).

Os sintomas comuns das infecções transmitidas por alimentos incluem diarreia, náuseas, vômitos, dores abdominais, febre e perda de apetite. Em casos de intoxicação alimentar, podem ocorrer manchas e coceira pelo corpo. A duração dos sintomas pode variar dependendo da condição física do indivíduo, do agente causador e da quantidade de alimento ou água ingerida. Os sintomas podem durar apenas algumas horas ou persistir por mais de cinco dias, dependendo do tipo de patógeno envolvido (Brasil, 2023b).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no período de 2007 a 2015, os alimentos contaminados foram responsáveis por 420.000 mortes e 600 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo. Isso significa que uma em cada dez pessoas fica doente após consumir alimentos contaminados. Globalmente, os agentes mais frequentes de doenças transmitidas por alimentos foram o norovírus e o *Campylobacter* spp., responsáveis pela maioria dos casos anuais de DTHA. Essas doenças afetam pessoas de todas as idades, mas cerca de 40% da carga global está concentrada em crianças menores de 5 anos e

em pessoas de baixa renda que vivem em sub-regiões do mundo (OMS, 2015). Em 2023, a Organização Mundial da Saúde (OMS) encontra-se em processo de realizar uma avaliação global da incidência de doenças transmitidas por alimentos. O propósito dessa iniciativa é apresentar estimativas atualizadas até 2025, com foco na proporção do ônus das doenças de origem alimentar atribuível à transmissão alimentar e a alimentos específicos. Essa meta requer a utilização de dados de surtos, considerados essenciais como uma das principais fontes de informação para analisar os agentes patogênicos envolvidos, permitindo a obtenção de estimativas específicas de atribuição a alimentos particulares. Essa análise de surtos pode ser conduzida tanto em nível nacional quanto regional e baseia-se na coleta de dados provenientes dos sistemas nacionais de vigilância de surtos (OMS, 2023).

Nesse contexto de notificações de surtos, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos estima que, no período de 2009 a 2021, foram notificados 47.706 surtos, resultando em 32.297 hospitalizações e 1.748 óbitos (CDC, 2023a). Na União Europeia, são notificados anualmente, em média, mais de 5.000 surtos de origem alimentar, causando aproximadamente 45.000 casos (EFSA, 2023).

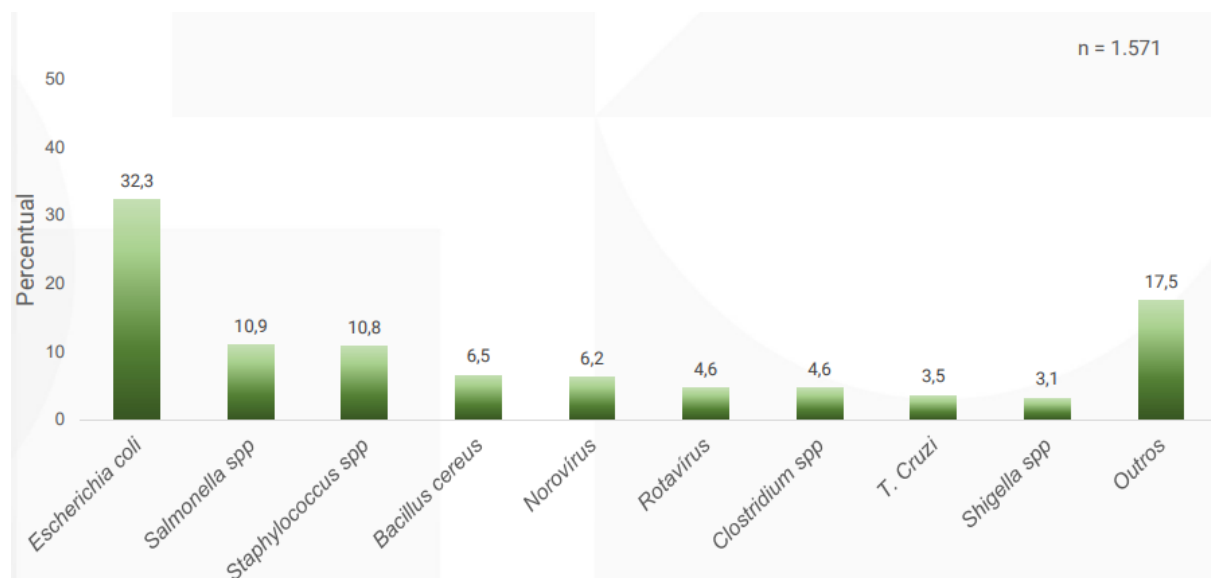
No Brasil, com base nas informações do Informe de 2023 sobre Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, apresentado pelo Ministério da Saúde e pela Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, evidencia-se que no intervalo de 2013 a 2022 ocorreram 6.523 surtos, impactando 107.513 pessoas. Essa incidência resultou em 12.722 hospitalizações e 112 óbitos. Entre as cinco regiões do país, a região Sudeste se destaca pelo elevado número de surtos relatados, sendo que, somente em 2022, foram registrados 400 casos (Brasil, 2023b).

Ao comparar os dados de surtos de DTHA entre os anos de 2020 e 2021 no Brasil, é evidente a marcante diferença nas estatísticas, principalmente considerando o contexto da pandemia de COVID-19 em 2020. Em 2020, com 292 surtos, registramos 4.600 casos de doença, 595 hospitalizações e 6 óbitos. Notavelmente, o número de surtos, casos e impactos hospitalares aumentou significativamente em 2021, com 546 surtos, 8.278 doentes, 639 hospitalizados e 10 óbitos (Brasil, 2023a). Essa disparidade pode ser atribuída não apenas ao aumento das notificações, mas também à influência das medidas de restrição e preocupações relacionadas à saúde pública durante a pandemia.

Em relação à distribuição dos surtos de DTHA por local de ocorrência no Brasil, observa-se que a maior proporção ocorreu em residências brasileiras (35,1%, n=6.523), seguida por surtos em restaurantes e padarias (15 %, n=6.523) entre 2013 e 2022. Quanto à distribuição dos principais agentes etiológicos identificados nos últimos anos, responsáveis por surtos

confirmados laboratorialmente, a bactéria *Escherichia coli* (32,3%) foi a mais comum, seguida por *Salmonella* spp. (10,9%) e *Staphylococcus aureus* (10,8%) (Brasil, 2023b) (Figura 1.1).

Figura 1.1 – Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados nos surtos de doenças de origem hídrica e alimentar no Brasil, 2013 a 2022.



Fonte: Sinan/SVS/Ministério da Saúde (BRASIL, 2023b).

Estes dados são importantes para entender o panorama nacional das DTHA. Os dados fornecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil revelam uma incidência significativa de surtos no país. Entretanto, é crucial ressaltar a fragilidade das notificações desses casos no Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA) e nos programas de controle, uma vez que essas informações disponíveis não refletem completamente a extensão real desse problema.

Além disso, a legislação brasileira referente à segurança de alimentos prontos para o consumo é abordada pela Instrução Normativa nº 161, de 1º de Julho de 2022, nos termos da Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 724, que estabelece as listas de padrões microbiológicos de alimentos (Brasil, 2022a, 2022b). Essas medidas são essenciais para promover a saúde pública e a segurança de alimentos, destacando a necessidade contínua de revisão e fortalecimento dessas diretrizes.

2 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS EM ALIMENTOS

2.1 MÉTODOS MOLECULARES BASEADOS EM PCR

Os métodos tradicionais, que empregam meio de cultura, são considerados padrão-ouro na microbiologia de alimentos, tendo em vista que proporcionam uma avaliação robusta da qualidade e segurança de alimentos. Esses métodos, baseados na capacidade de cultivar e identificar microrganismos, oferecem uma compreensão detalhada da microbiota presente. Contudo, é importante ressaltar que, embora eficazes, esses procedimentos demandam extenso tempo e recursos materiais para serem concluídos. As etapas de isolamento, crescimento e identificação microbiana podem se estender consideravelmente, impactando a agilidade necessária na detecção de contaminantes alimentares. À medida que avançamos, há uma crescente busca por métodos alternativos que, mantendo a precisão, possam otimizar o tempo e os recursos envolvidos nas análises microbiológicas de alimentos (Ceuppens *et al.*, 2014; Postollec *et al.*, 2011).

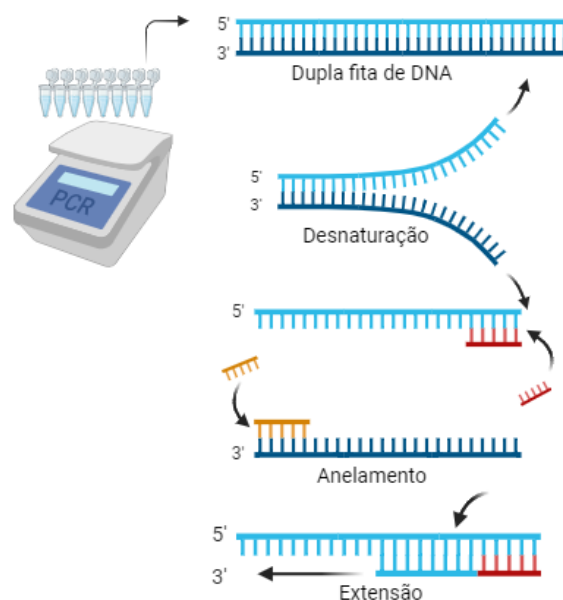
Nesse contexto, muitos métodos de detecção de patógenos transmitidos por alimentos e água foram desenvolvidos e aprimorados para atender às demandas crescentes de segurança de alimentos e saúde pública, especialmente no que se refere a alimentos frescos e minimamente processados. Estudos destacam que as técnicas moleculares surgem como alternativas promissoras em comparação aos métodos clássicos da microbiologia de alimentos, devido à sua versatilidade, especificidade e sensibilidade. Essas abordagens proporcionam resultados rápidos e confiáveis, contribuindo assim para um monitoramento mais eficiente da qualidade e segurança dos alimentos (Ceuppens *et al.*, 2014; Wang; Salazar, 2016).

Desde o advento da Reação em Cadeia da Polimerase, conhecida como *Polymerase chain reaction* (PCR), na área da biologia molecular, esse método tem sido amplamente utilizado para a detecção da presença ou ausência de patógenos em alimentos. A PCR possibilita a amplificação de pequenas quantidades de um fragmento de DNA alvo específico, presente apenas no patógeno em questão, revolucionando as análises microbiológicas tradicionais (Chapela; Garrido-Maestu; Cabado, 2015). A PCR convencional consiste na amplificação de ácidos nucleicos por meio de ciclos de variação de temperatura (Wu *et al.*, 2020). Normalmente, esse procedimento envolve três etapas fundamentais: desnaturação, anelamento e extensão (Figura 1.2). A desnaturação ocorre no início da reação, onde o DNA molde contendo a sequência a ser amplificada é desnaturado a uma temperatura de aproximadamente 95 °C. Na etapa de anelamento, um par de iniciadores é utilizado para complementar a fita oposta da sequência de DNA que será amplificada. Por fim, na etapa de extensão, a enzima DNA polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita (Chen *et al.*, 2017). A

eletroforese em gel de agarose é comumente utilizada para visualizar os resultados da amplificação por PCR, empregando um corante intercalante de DNA, como o brometo de etídio, permitindo a detecção direta do fragmento de DNA alvo pesquisado.

Ensaio de PCR foram desenvolvidos para detectar uma variedade de patógenos bacterianos de origem alimentar, como *Salmonella* (Chiu *et al.*, 2005), *Listeria monocytogenes* (Cocolin *et al.*, 2005), *Yersinia enterocolitica* (Estrada *et al.*, 2007), *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7 e *Shigella* spp. (Shekar *et al.*, 2017). Nos últimos anos, ensaios de PCR têm sido desenvolvidos para a detecção de uma ampla variedade de bactérias, fungos e vírus, incluindo os principais patógenos transmitidos por alimentos.

Figura 1.2 – Passos da reação em cadeia da polimerase.

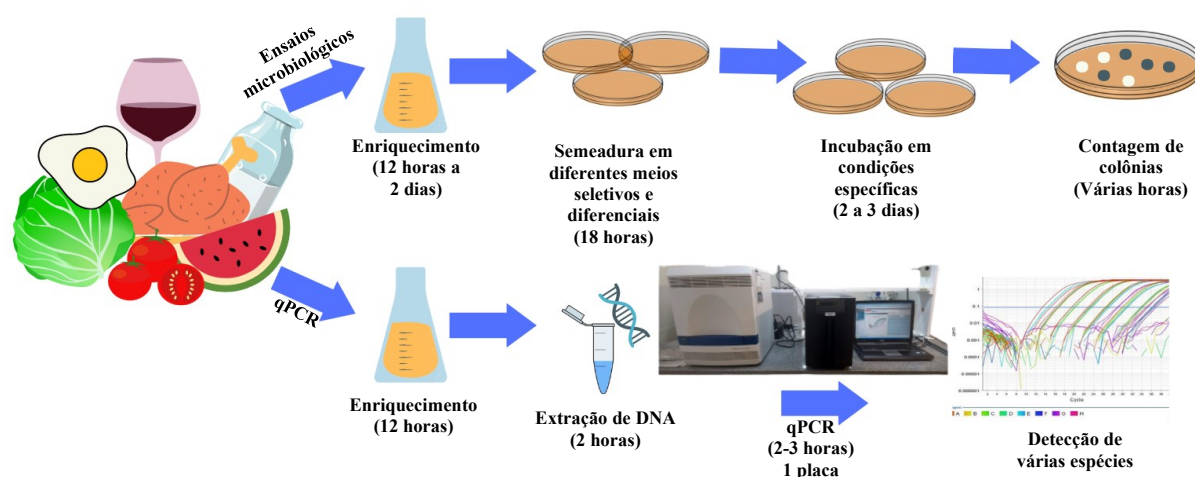


Fonte: BioRender.com.

A PCR evoluiu para a PCR quantitativa (qPCR), que é baseada na detecção do aumento do sinal fluorescente gerado durante cada ciclo de amplificação *in vitro* (Heid *et al.*, 1996; Umesha; Manukumar, 2018). A qPCR consiste em uma série de ciclos de amplificação divididos em três fases distintas. A fase lag é o estágio inicial da reação, em que a amplificação ainda não é detectável. Em seguida, temos a fase exponencial, na qual os produtos da amplificação se duplicam a cada ciclo. Nessa etapa, o aumento exponencial dos *amplicons* pode ser monitorado em tempo real, a cada ciclo, utilizando um sinal fluorescente. O aumento na fluorescência é plotado em relação ao número de ciclos, gerando a curva de amplificação, a

partir da qual pode-se determinar o valor do C_q (ciclo de quantificação). O final da reação corresponde à fase de platô, na qual não há mais aumento dos produtos da amplificação (Heid *et al.*, 1996; Postollec *et al.*, 2011). O método qPCR Multiplex permite a detecção simultânea de múltiplas sequências-alvo em uma mesma amostra em questão de horas. Em comparação, os métodos tradicionais que utilizam meio de cultura requerem mais material e podem levar dias para serem concluídos, apresentando assim desvantagens em relação a qPCR (Figura 1.3) (Martínez *et al.*, 2011).

Figura 1.3 – Comparação de métodos microbiológicos convencionais e qPCR para a quantificação de microrganismos em amostras de alimentos.



Fonte: autora (2022) adaptado de Martínez *et al.* (2011).

O número de publicações que utilizam a técnica de qPCR tem aumentado de forma significativa ao longo dos anos, desde os primeiros trabalhos científicos publicados (Heid *et al.*, 1996), tornando-se uma referência importante na área da ciência dos alimentos (Postollec *et al.*, 2011). A técnica de qPCR tem sido amplamente aplicada na detecção e quantificação de patógenos em diversas matrizes alimentares, como demonstrado em estudos recentes. Por exemplo, a detecção rápida e quantitativa de *Bacillus cereus* no leite (Zhou *et al.* 2019), *Vibrio parahaemolyticus* em camarão (Ling *et al.*, 2020), norovirus humano GII.4 em mexilhões (Randazzo *et al.*, 2018), *Campylobacter* em carcaças de frango (Duarte *et al.*, 2015) e vírus HAV em amostras de alimentos e água (Randazzo *et al.*, 2017).

A qPCR também tem sido utilizada em estudos para avaliar a eficácia de processos de desinfecção contra patógenos em instalações de processamento de alimentos (Brauge *et al.*, 2020; Faille *et al.*, 2020; Kragh; Thykier; Hansen, 2020; Lee; Lee; Kim, 2015; Mougin *et al.*,

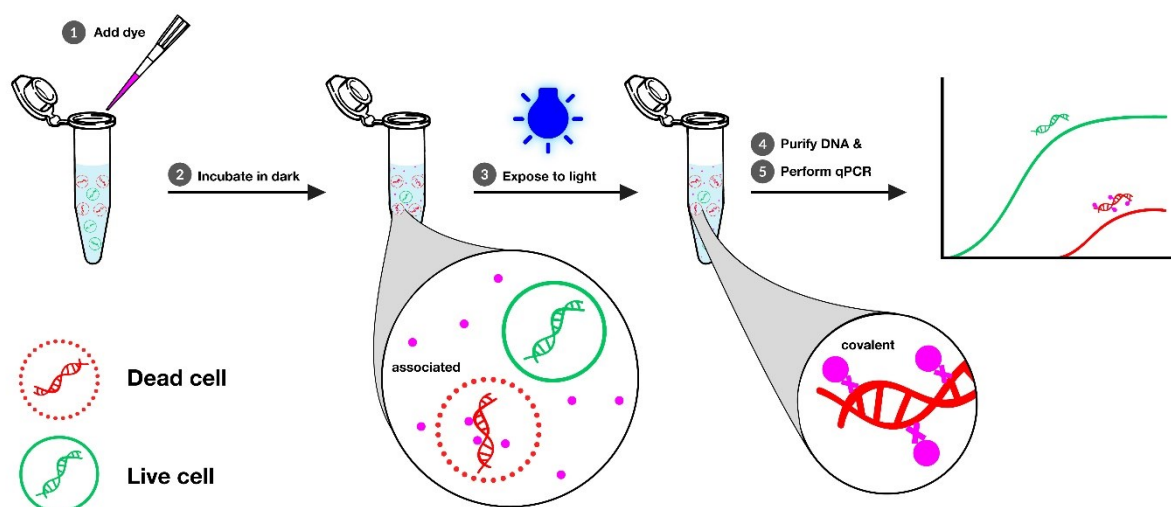
2019). A qPCR possibilitou a quantificação de microrganismos específicos, revolucionando as análises microbiológicas de alimentos. A utilização desta técnica é vantajosa, visto que proporciona economia de tempo e esforço, além de eliminar a necessidade de tratamento pós-amplificação das amostras, como o uso de eletroforese em gel de agarose (Chapela; Garrido-Maestu; Cabado, 2015).

2.2 USO DE CORANTES INTERCALANTES DE DNA NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS E NÃO VIÁVEIS ACOPLADO A QPCR

A qPCR é uma técnica consolidada na biologia molecular, mas é importante ressaltar que devido à sua alta sensibilidade, variações mínimas podem resultar em diferenças significativas nos resultados (Postollec *et al.*, 2011). Além disso, os métodos de PCR ainda enfrentam algumas desvantagens, como a presença de substâncias naturalmente presentes nas amostras alimentares que podem inibir a reação de amplificação, bem como a dificuldade de distinguir entre células viáveis e não viáveis, o que pode levar a uma superestimação dos resultados (Elizaquível *et al.*, 2013).

Para superar essas limitações, uma alternativa proposta em 2003 por Nogva e colaboradores, com o uso de monoazida de etídio (EMA) em conjunto com a técnica de PCR para diferenciar bactérias viáveis e não viáveis (Nogva *et al.*, 2003). Posteriormente, o uso de propídio monoazida (PMA) mostrou-se ainda mais eficiente, especialmente para certas espécies bacterianas, uma vez que o EMA também pode penetrar em células viáveis (Nocker; Cheung; Camper, 2006). Esses corantes intercalantes de DNA, como EMA e PMA, são adicionados às amostras antes da extração de DNA e penetram seletivamente nas células apenas se sua membrana estiver comprometida. Uma vez em contato com o DNA, eles se ligam covalentemente a ele. Após a exposição à luz, ocorre a reação covalente, modificando o DNA e impedindo a amplificação subsequente por PCR (Figura 1.4) (Elizaquível; Aznar; Sánchez, 2014; Fittipaldi; Nocker; Codony, 2012; Nocker; Cheung; Camper, 2006). No entanto, é importante otimizar os parâmetros de concentração dos corantes de DNA e o tempo de exposição para a luz de acordo com a matriz analisada (Van Frankenhuyzen *et al.*, 2011).

Figura 1.4 – Descrição representativa da reação de células viáveis e não viáveis com corantes de viabilidade em conjunto com a técnica qPCR.



Fonte: (Biotium, 2022).

Desde o surgimento dos corantes EMA e PMA, essas substâncias têm sido amplamente aplicadas no estudo de diversos patógenos. Além disso, o PMA foi aprimorado para a versão PMAxx™, que possui propriedades espectrais semelhantes e também tem demonstrado eficácia (Randazzo *et al.*, 2017). O PMAxx™ tem sido utilizado em várias aplicações como um pré-tratamento antes da análise por qPCR para detecção de bactérias e vírus de origem alimentar. Essas técnicas de pré-tratamento têm se mostrado valiosas na melhoria da especificidade dos resultados e no fornecimento de informações mais precisas sobre a presença de patógenos em alimentos (Bernardo *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2019a; Han *et al.*, 2018; Lv *et al.*, 2021; Randazzo *et al.*, 2018; Razafimahefa *et al.*, 2021; Rousseau *et al.*, 2019; Shirasaki *et al.*, 2020; Truchado *et al.*, 2020; Wulsten; Galeev; Stingl, 2020; Xie *et al.*, 2021).

O uso de corantes intercalantes de DNA em combinação com a qPCR é uma técnica que pode ser empregada para detecção de patógenos. No entanto, é importante destacar que a escolha dos métodos específicos, incluindo corantes e protocolos, pode variar de acordo com a natureza do patógeno, os objetivos da pesquisa e as preferências laboratoriais.

2.3 REVISÃO DE LITERATURA E PROSPECÇÃO CIENTÍFICA SOBRE v-PCR

As revisões de literatura desempenham um papel fundamental na pesquisa acadêmica e científica, guiando pesquisadores no desenvolvimento de estudos originais e contribuindo

para o avanço contínuo do conhecimento em diversas áreas. Estudos de revisão de literatura abordaram o uso de corantes intercalantes de DNA e ensaios moleculares baseados em PCR para detectar patógenos de origem alimentar, ressaltando desafios experimentais e apresentando novas estratégias desenvolvidas para aprimorar os ensaios de vPCR (Corantes de viabilidade combinados com o método qPCR).

Elizaquível; Aznar e Sánchez (2014) relataram a crescente incidência de surtos de origem alimentar e a demanda por métodos eficazes de monitoramento da segurança de alimentos. Destacaram a importância de métodos rápidos, sensíveis e específicos, a pesquisa focou na aplicação da PCR em tempo real em conjunto com corantes de viabilidade. Nesta revisão, os autores relatam que os corantes demonstraram sucesso na detecção específica de patógenos viáveis de origem alimentar, abrangendo bactérias e vírus.

Chin *et al.* (2022) destacaram os desenvolvimentos dessas técnicas, com ênfase especial nos avanços do qPCR na detecção e identificação de patógenos como *Salmonella* e norovírus. A análise abrangente também discutiu as limitações dos métodos tradicionais, incluindo a cultura convencional e a PCR convencional, na detecção desses patógenos específicos. Além disso, avanços da vPCR e a PCR digital (dPCR) são explorados, destacando seu papel na detecção eficaz de *Salmonella* e norovírus.

Zhao *et al.* (2020) reportaram que que diversas técnicas de PCR, incluindo aquelas voltadas para a detecção do *Staphylococcus*, foram desenvolvidas nesse contexto. A PCR quantitativa fluorescente em tempo real mostrou-se mais eficaz em comparação com a PCR convencional, embora seu custo seja elevado, limitando seu escopo de aplicação.

Em uma investigação conduzida por Gao *et al.* (2021), foram sumarizadas ferramentas de diagnóstico para patógenos em estado viável, mas não cultiváveis (VBNC) na indústria alimentar. Além dos métodos de detecção de amplificação de ácido nucleico, a revisão abordou alternativas como impedância, marcadores fluorescentes em citometria de fluxo e espectroscopia Raman de superfície. O estudo de Dong *et al.* (2019a) forneceu uma análise sistemática das espécies de microrganismos, fatores de indução e métodos de detecção específicos para VBNC. A revisão destacou que mais de 100 espécies de microrganismos VBNC foram comprovadas em contextos relacionados à segurança de alimentos, meio ambiente e doenças agrícolas. Um levantamento sistemático sobre vírus realizado por Leifels *et al.* (2021) destacou que os agentes PMA e PMAxx apresentaram maior eficiência na redução de falsos negativos em qPCR, em comparação com o corante intercalante EMA, para vírus.

Além das revisões na literatura, a utilização de estudos prospectivos, tem se revelado uma ferramenta importante para a caracterização do cenário científico, como já reportado no

campo da microbiologia de alimentos. Feitosa *et al.* (2022) conduziu uma prospecção científica em três fases distintas: inicialmente, uma avaliação de elegibilidade foi realizada, seguida pela triagem e inclusão de artigos, finalizando com a etapa de extração de informações na área de microbiologia. O estudo conduzido por Souza *et al.* (2018) teve como propósito realizar uma revisão sistemática e uma previsão tecnológica das evidências relacionadas à utilização do extrato pirolenhoso como potencial agente antimicrobiano. A identificação dos estudos ocorreu por meio de uma busca em diversas bases de dados eletrônicas.

Até o momento, não há registros de estudos prospectivos abordando a temática de corantes intercalantes de DNA e ensaios moleculares baseados em PCR para a detecção de patógenos de origem alimentar. A realização de uma prospecção nesse contexto se revelaria fundamental, oferecendo um diferencial em relação às revisões de literatura já realizadas, ao fornecer um levantamento anual abrangente do número de publicações, a origem geográfica dos estudos e as principais palavras-chave frequentemente citadas nesse campo específico. Essa abordagem prospectiva visa preencher uma lacuna no conhecimento atual e oferecer conhecimento valiosos para orientar futuras pesquisas e desenvolvimentos nesse domínio científico.

3 CONHECIMENTO SOBRE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA A DETECÇÃO DE PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR

3.1 USO DE QUESTIONÁRIOS COMO FERRAMENTA DE COLETA EM PESQUISAS NA ÁREA DE SEGURANÇA DE ALIMENTOS

Os questionários desempenham um papel fundamental na pesquisa científica e na tomada de decisões informadas em diversos campos. Eles oferecem uma maneira eficaz e escalonável de coletar dados, permitindo que os pesquisadores analisem, compreendam e resolvam uma variedade de questões e problemas.

Estudos com questionário online tornaram-se ferramentas importantes na área de segurança de alimentos no Brasil e mundialmente. Finger *et al.* (2021) conduziu uma avaliação da conformidade da população brasileira com as diretrizes de higiene alimentar e medidas de proteção individual recomendadas para mitigar a propagação da Covid-19. Um questionário online abordando tópicos relacionados à higiene alimentar e às precauções individuais foi amplamente divulgado na internet e em plataformas de mídia social. Os dados foram coletados

de 3.000 participantes entrevistados durante o estudo. A grande maioria dos entrevistados demonstrou aderir às práticas de higiene e proteção pessoal recomendadas como medida preventiva contra a contaminação pelo SARS-CoV-2. No entanto, foram identificadas algumas lacunas significativas, tais como a não utilização de máscaras faciais em espaços públicos (6%), a execução inadequada da lavagem e higienização das mãos (10–12%) e o uso inadequado de produtos para a limpeza e higienização de alimentos ou ambientes (28%).

Mucinhato *et al.* (2022) realizaram uma investigação sobre o comportamento inadequado na manipulação de alimentos, utilizando uma abordagem teórica que incluiu a consideração do conhecimento e da percepção de risco, aplicada a famílias durante a pandemia de Covid-19. O estudo contou com a participação de 1.068 consumidores no Brasil, antes do início do programa de vacinação contra a Covid-19, por meio de um questionário online. Este estudo acrescentou à literatura sobre segurança de alimentos ao evidenciar os efeitos positivos da pandemia nos fatores preditivos do comportamento do consumidor, na percepção de risco e no conhecimento relacionado à segurança de alimentos no ambiente doméstico.

Martins *et al.* (2022) utilizaram questionário online com objetivo de avaliar o conhecimento sobre a tecnologia de micro-ondas, abrangendo tanto a segurança do forno de micro-ondas quanto a segurança de alimentos do seu uso, entre consumidores brasileiros (n = 494) e portugueses (n = 460). Foi possível concluir neste estudo, que os brasileiros predominantemente utilizam fornos de micro-ondas para reaquecer e preparar alimentos congelados de origem comercial. Contudo, é notável que 3,6% ainda optam por recipientes de metal, 19,7% negligenciam a leitura das instruções de reaquecimento, e 12,2% não consultam as orientações de cozimento. Em contraste, os consumidores portugueses demonstraram uma compreensão mais aprofundada da potência aplicada nos fornos micro-ondas, um parâmetro importante para a uniformidade do aquecimento e a prevenção de pontos frios, os quais podem representar riscos microbiológicos.

Em síntese, os questionários oferecem uma maneira eficaz de coletar dados, compreender e resolver questões importantes. Na área da segurança de alimentos, especialmente durante a pandemia da Covid-19, eles têm sido essenciais para avaliar o comportamento das pessoas.

3.2 CONHECIMENTO SOBRE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS E ÁGUA

O conhecimento aprofundado sobre microrganismos patogênicos é de relevância para profissionais do setor de alimentos, bem como para a população. Um fator importante na prevenção de doenças transmitidas por alimentos reside na manipulação adequada dos alimentos pelos indivíduos em suas residências durante o processo de preparo (Saeed; Osaili; Taha, 2021). A capacidade de identificar esses patógenos e mitigar esses riscos é vital.

Estudos internacionais concluíram que muitos manipuladores de alimentos não têm conhecimento suficiente sobre temas relacionados a segurança de alimentos. Akonor e Aknor (2013) avaliaram o conhecimento de 608 manipuladores domésticos de alimentos em Accra, capital de Gana, maioria dos entrevistados estavam familiarizada com *Salmonella* (69,7%), mas não com *E. coli* (36,2%), embora estas duas bactérias patogênicas estejam amplamente vinculadas a surtos de DTSA (OMS, 2015). Outra pesquisa realizada com manipuladores de alimentos em escolas de Camaçari, Brasil, reportou que 56,6% dos 166 participantes não sabiam que *Staphylococcus aureus* é um microrganismo patogênico responsável por causar intoxicação alimentar (Soares *et al.*, 2012). Myintzaw *et al.* (2020) conduziram uma pesquisa na Irlanda que visou avaliar a percepção de risco e o conhecimento dos consumidores em relação ao manuseio de aves domésticas. Este estudo envolveu 1.171 participantes na Irlanda e foi motivado pela alta ocorrência de *Campylobacter* na carne de frango. Os resultados revelaram que o grupo de indivíduos do sexo masculino, com idades entre 18 e 25 anos, níveis educacionais primários ou ausência de qualificações formais, e que vivem sozinhos, demonstrou comportamentos particularmente inseguros no manuseio de aves, destacando a necessidade de esforços de comunicação de risco direcionados a esse grupo específico.

Estudos abordando participantes com nível de educação superior foram conduzidos, revelando percepções equivocadas em relação aos patógenos alimentares. Piantola *et al.* (2018) conduziram um estudo no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil. Os participantes estavam matriculados na disciplina de Bacteriologia. Foram considerados para esta pesquisa um total de 68 alunos, que frequentaram o curso nos anos letivos de 2014 e 2015. Algumas das respostas dadas pelos alunos incluíam informações como "A bactéria *Streptococcus aureus* é um patógeno gram-positivo, produtor de antibióticos e oportunista da pele". Os autores esclarecem que essas respostas se basearam em experiências pessoais, uma vez que os participantes não tinham frequentado cursos de microbiologia antes de ingressarem na universidade.

Um questionário realizado com o objetivo de avaliar o conhecimento, atitudes e práticas de prevenção da intoxicação alimentar entre 212 estudantes de pós-graduação de uma universidade pública em Selangor, Malásia, revelou que, em relação à causa da intoxicação

alimentar, 91% dos participantes responderam corretamente "bactéria", enquanto 53,8% responderam incorretamente "vírus" e 47,6% mencionaram erroneamente "parasitas" (Mshelia; Osman; Misni, 2022). Marklinder *et al.* (2020) avaliaram o conhecimento sobre segurança dos alimentos em uma amostra de 606 entrevistados de 24 universidades na Suécia. Os resultados revelaram lacunas significativas no conhecimento, com 21% dos participantes indicando não saber que "bactérias patogênicas podem causar morte em seres humanos" e 46% desconhecendo que "a bactéria da espécie *Listeria* está principalmente associada ao consumo de frango cru". Osaili *et al.* (2011) realizaram um estudo sobre conhecimentos e práticas de segurança dos alimentos entre estudantes universitários no Norte da Jordânia, e envolveu a participação de um total de 867 alunos. Menos de 18% dos participantes demonstraram conhecimento sobre os alimentos mais comumente associados a patógenos como *Staphylococcus*, *Listeria*, *E.coli*, *Trichinella* e *Campylobacter*. Aproximadamente 33% dos entrevistados estavam cientes de que o contato com frango cru pode resultar na contaminação de outros alimentos com *Salmonella*, caso as mãos não sejam devidamente lavadas, enquanto 44% reconheceram que o cozimento adequado dos alimentos é eficaz para eliminar a *Salmonella* presente neles.

Conforme um estudo de conscientização sobre doenças transmitidas por alimentos entre estudantes na Arábia Saudita, foi constatado que 85,5% dos 429 entrevistados conseguiram identificar as causas da intoxicação alimentar. No entanto, metade dos participantes não tinha conhecimento da distinção entre intoxicação alimentar e infecção alimentar (Al-Mohaithef *et al.*, 2020). Mahmood *et al.* (2018) pesquisaram a consciência e as práticas relativas à manipulação de alimentos entre os estudantes estrangeiros da Universiti Sains Malaysia (USM), Penang, Malásia. Observou-se boa compreensão dos sintomas de intoxicação alimentar entre os entrevistados, principalmente no grupo feminino.

O conhecimento sobre microrganismos patogênicos é de fundamental importância, não apenas para profissionais do setor de alimentos, mas também para a população em geral. Os resultados desses estudos destacam a importância de programas educacionais abrangentes, tanto para manipuladores de alimentos quanto para o público em geral, a fim de promover práticas seguras de manipulação e preparo de alimentos, reduzindo assim os riscos associados a infecções alimentares.

3.3 CONHECIMENTO SOBRE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR BASEADAS EM PCR

O desenvolvimento do currículo na área de Biologia Molecular tornou-se fundamental para a formação acadêmica (Chen *et al.*, 2016). A Biologia Molecular, em geral, abrange conceitos básicos das células e seus constituintes, além do conhecimento sobre a função e estrutura dos genes em nível molecular, juntamente com o estudo de técnicas experimentais. Diversas pesquisas foram realizadas para investigar o conhecimento e as atitudes em relação à biotecnologia entre estudantes do ensino médio, graduação e pós-graduação. Kooffreh, Ikpeme e Mgbado (2021) conduziram um estudo para investigar o conhecimento, a percepção e o interesse de estudantes nigerianos do ensino médio em relação à biotecnologia. Os resultados revelaram que 105 (34,21%) dos estudantes possuíam um conhecimento limitado sobre biotecnologia médica, engenharia genética e produtos geneticamente modificados. Öztürk-Akar (2017) avaliou o conhecimento de 465 universitários turcos sobre biotecnologia e suas atitudes em relação às aplicações biotecnológicas. Neste estudo, o autor constatou que, embora os estudantes graduandos em ciências apresentassem pontuações mais altas de conhecimento e atitude em comparação com os não graduandos em ciências, não foi possível afirmar que eles possuíam conhecimento suficiente sobre biotecnologias.

Shi *et al.* (2010) entrevistaram 1.300 alunos em três instituições, utilizando perguntas abertas, para avaliar a compreensão de conceitos fundamentais e conhecimentos básicos em biologia molecular e celular. Os autores relataram que todos os alunos demonstraram ganhos de aprendizagem ao final de seus cursos. Por outro lado, o estudo conduzido por Couch, Wood e Knight (2015) indicou que os alunos têm uma compreensão incompleta de muitos conceitos de biologia molecular, com base nos resultados de desempenho. Southard *et al.* (2016) realizaram entrevistas semiestruturadas e clínicas de pensamento em voz alta com estudantes introdutórios e de nível superior em biologia molecular e celular. As entrevistas incluíram uma avaliação conceitual escrita, uma atividade de mapeamento de conceitos e uma oportunidade para explicar os mecanismos de replicação, transcrição e tradução do DNA. Uhl *et al.* (2021) investigaram a compreensão de conceitos básicos de estudantes de graduação em biologia introdutória sobre o fluxo de informação genética. Além disso, um estudo de caso sobre as atitudes em relação à genética entre estudantes do ensino médio no Brasil foi conduzido, e a maioria dos alunos acreditava que os alimentos transgênicos deveriam ser incentivados e apoiavam fortemente a rotulagem desses alimentos (Massarani; De Castro Moreira, 2005).

No campo da biologia molecular e biotecnologia, o uso de técnicas como PCR e qPCR está se tornando cada vez mais comum em laboratórios de análises, em diversas áreas de pesquisa e na formação acadêmica, devido à rapidez na obtenção de resultados, o que as torna altamente desejáveis nesses segmentos (Chapela; Garrido-Maestu; Cabado, 2015). Com o

interesse e a compreensão das tecnologias modernas e a crescente importância da detecção de DNA na segurança de alimentos, é necessário fortalecer o ensino de técnicas experimentais no currículo, para promover o debate e o contexto de informações científicas entre os estudantes. No entanto, estudos sobre o conhecimento de estudantes de graduação em relação às técnicas baseadas em PCR, principalmente no Brasil, precisam ser realizados.

3 GÊNERO *CRONOBACTER* E OCORRÊNCIA DE INFECÇÕES

Em 1980, o gênero *Cronobacter*, anteriormente identificado como *Enterobacter sakazakii*, foi formalmente estabelecido como uma nova espécie (Farmer *et al.*, 1980). Atualmente, o gênero *Cronobacter* engloba as seguintes espécies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. universalis*, *C. dublinensis*, *C. mytjensii* e *C. condimenti* (Iversen *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2012). O gênero *Cronobacter*, pertencente à família Enterobacteriaceae, é composto por várias espécies de bactérias gram-negativas, anaeróbio facultativo, causador de doenças, especialmente em neonatos. As principais manifestações clínicas incluem bacteremia, meningite e enterocolite necrosante, podendo levar a incapacidade neurológica e morte (Strysko *et al.*, 2020). Essas bactérias podem sobreviver em alimentos com baixa atividade de água, como fórmula infantil em pó, leite em pó, chás de ervas e amidos (CDC, 2022; FDA, 2012).

Diante da importância das doenças infecciosas, a atenção internacional voltou-se para a segurança dos alimentos para bebês, especialmente na prevenção de infecções potencialmente graves em neonatos. Desde 2004, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) realizaram duas reuniões técnicas conjuntas para abordar patógenos bacterianos em fórmulas infantis em pó, incluindo a presença de *Enterobacter sakazakii* (atualmente denominada *Cronobacter sakazakii*) (FAO/OMS, 2008). As infecções por *Cronobacter* são consideradas raras, com cerca de dois a quatro casos notificados ao CDC a cada ano, mas podem ser fatais em recém-nascidos, ocorrendo nos primeiros dias ou semanas de vida (CDC, 2022). Além dos casos em neonatos, a literatura também relata surtos e casos isolados de infecções em pessoas de todas as faixas etárias em diversos países (FAO/OMS, 2008).

Um estudo realizado por Strysko *et al.* (2020) analisou casos de infecção invasiva por *Cronobacter* em bebês relatados ao CDC e documentados na literatura no período de 1961 a 2018. Foram identificados 183 casos de bebês que se encaixavam na definição de caso: 66 casos descritos na literatura, 61 casos relatados ao CDC, 53 casos relatados pela OMS/FAO e 3 casos

do PubMLST. Os casos foram notificados em 24 países e 6 continentes. No Brasil, foram reportados oito casos nesse estudo.

Outro levantamento realizado por Brandão; Umeda e De Filippis (2018) revelou que casos de infecções por *Cronobacter* spp. também foram notificados no Brasil no período de 1997 a 2013. As espécies identificadas foram *C. sakazakii* e *C. malonaticus*. Os principais afetados nesses surtos e casos foram recém-nascidos e neonatos nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Piauí. No entanto, os autores destacam que o número de notificações provavelmente é subestimado. Após um alerta mundial sobre infecções por *Cronobacter* conduzido pela *Food and Drug Administration* (FDA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determinou o recolhimento de lotes de cinco marcas de fórmulas infantis no Brasil. A investigação internacional relatou que quatro bebês apresentaram infecção por *C. sakazakii*, sendo que dois deles faleceram (Brasil, 2022c; FDA, 2022). No último boletim epidemiológico de surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar publicado em 2023 pelo Ministério da Saúde do Brasil, não foram especificadas ocorrências cujo agente etiológico fosse *Cronobacter* spp. (Brasil, 2023b). Isso sugere que os casos de infecção por *Cronobacter* spp. não são frequentes, mas podem estar subnotificados, não sendo relatados da mesma forma que outras infecções alimentares mais comuns, como *Salmonella* ou *E. coli* O157:H7 (FDA, 2022). As infecções por *Cronobacter* estão frequentemente associadas à fórmula infantil em pó, uma vez que essa pode ser contaminada em residências ou nas instalações de processamento.

A legislação brasileira atual, por meio da Instrução Normativa nº 161/2022, estabelece como padrão microbiológico a ausência de *Cronobacter* spp. em 30 unidades do plano amostral para fórmulas infantis em pó destinadas a lactantes de até seis meses de idade, fórmulas infantis para necessidades dietoterápicas específicas, fórmulas de nutrientes, fórmulas padrão para nutrição enteral, fórmulas modificadas para nutrição enteral e módulos para nutrição enteral em pó (Brasil, 2022b). Essas matrizes alimentares referidas na legislação estão em consonância com os alimentos que são destacados como fontes de ocorrência de infecções por *Cronobacter* spp., uma vez que as fórmulas infantis desidratadas já foram epidemiologicamente identificadas como veículos de contaminação em casos de infecções (FDA, 2022; Rufián-Henares; Guerra-Hernández; García-Villanova, 2013; Strysko *et al.*, 2020).

Um estudo conduzido por Akineden *et al.* (2017) teve como objetivo esclarecer a situação de isolados de *Cronobacter* provenientes de inquéritos realizados entre 2003 e 2006 com contaminação de fórmula infantil em pó, molho de maçã e da polpa de frutas para a nutrição infantil na Alemanha. Por sua vez, Mohammed; Sallam e Tamura (2015) determinaram

a prevalência de *C. sakazakii* em 357 produtos à base de carne vendidos na cidade de Mansoura, Egito. Nessa pesquisa, dos 93 isolados obtidos a partir de 90 amostras de produtos cárneos, 14 foram identificados como *C. sakazakii*. Já Xu *et al.* (2015) investigaram, na maioria das capitais provinciais da China, a prevalência, caracterização molecular e suscetibilidade a antibióticos de *Cronobacter* spp. em alimentos chineses prontos para consumo. Os alimentos pesquisados incluíram fórmula infantil em pó, vegetais frios em amostras de pratos de molho, macarrão frio em amostras de molho e arroz frito ou macarrão.

Costa *et al.* (2021) avaliaram a diversidade do gênero *Cronobacter* isolado entre 1970 e 2019 no continente americano e realizaram sua caracterização por meio da tipagem de sequência multilocus (MLST) usando informações disponíveis no banco de dados PubMLST e na literatura atual. Do total de 465 cepas de *Cronobacter* spp. examinadas, a maioria (267, representando 57,4%) era da América do Norte, principalmente dos Estados Unidos, que contribuíram com 234 cepas, enquanto 198 cepas (42,6%) foram identificadas na América do Sul, com ênfase no Brasil, que contribuiu com 196 cepas. A presença desses patógenos nesses alimentos indica um potencial ameaça à saúde humana, especialmente para crianças, idosos ou imunossuprimidos.

3.1 OCORRÊNCIA DE *CRONOBACTER* spp. EM ALIMENTOS

Pesquisas com *Cronobacter* spp. em ambientes produtores de alimentos, bem como em alimentos destinados para crianças, foram realizadas no Brasil e em outros países (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Diferentes alimentos e ambientes onde espécies de *Cronobacter* foram registradas em diversos países.

Fonte	Localização	Técnica	Amostras (Prevalência %)	Referência
Saladas prontas para consumo (RTE) e alimentos da culinária japonesa	Brasil	Norma ISO 22964:2017; PCR multiplex	27/30 culinária japonesa (90%) e 13/30 saladas RTE (43,33%)	(Vasconcellos <i>et al.</i> , 2018)
Água mineral	Brasil	Número Mais Provável; ISO 22964:2017; PCR em tempo real	1/33 lotes (3,03%)	(Vasconcellos <i>et al.</i> , 2019)

Misturas de cereais para crianças, especiarias e ervas e farinhas	Brasil	Testes fenotípicos, ensaios moleculares e suscetibilidade a antibióticos	38/90 (42,22%)	(Brandão <i>et al.</i> , 2017)
Queijos	Brasil	ISO 22964:200610 PCR multiplex	1/90 (1,11%)	(Brandão <i>et al.</i> , 2016)
Fórmula infantil em pó		Ensaio bioquímicos, kits miniaturizados e a metodologia ISO/TS 22964:2006 e PCR	27/ 37 cepas (72,97%)	(Warnken <i>et al.</i> , 2012)
Aveia e linhaça		Método padronizado de difusão de disco Bauer-Kirkby usando ágar Mueller-Hinton; PCR em tempo real	19/34 linhaça (55,88%) 15/34 de aveia (44,12%)	(Silva <i>et al.</i> , 2019)
Produtos aquáticos-peixe e camarão	China	PCR, teste de suscetibilidade antimicrobiana e tipagem de sequência multilocus; Tipagem CRISPR e análise de cluster.	31/800 (3,88%)	(Li <i>et al.</i> , 2020)
Cereais infantis	Brasil	PCR; Maldi-TOF/MS	13/75 (17,33%)	(Carvalho <i>et al.</i> , 2020)
Carne e produtos à base de carne	Cantão, China	PCR; CRISPR	54/588 (9,18%)	(Zeng <i>et al.</i> , 2020)
Leite infantil em pó	Cidade de Teerã, Irã	Genotipagem ERIC-PRC	25/364 (6,87%)	(Pakbin <i>et al.</i> , 2022)
Fábrica de leite em pó	Sérvia	PCR em tempo real; Tipagem de sequência multilocus (MLST) e análise de sequência	15/100 (15%)	(Csorba <i>et al.</i> , 2022)
Instalações de fabricação de leite em pó	Maryland, EUA	As identificações dos isolados foram realizadas utilizando tiras de	2.495/5.671 (44,04%)	(Hayman <i>et al.</i> , 2020)

		identificação bioMerieux Rapid 32 E ou VITEK 2		
Sepse neonatal	Egito	RT-PCR	12/100 (12%)	(Elkhawaga <i>et al.</i> , 2020)
Amostras clínicas de fezes humanas	Wenzhou, China	PCR	12/1024 (1.17%)	(Zhang <i>et al.</i> , 2018)
<i>Filth flies</i>	EUA, Europa, Sudeste Asiático	PCR; sequenciamento do genoma	19 cepas/14 moscas	(Jang <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: autora (2023).

O estudo conduzido por Vasconcellos *et al.* (2018) isolou e identificou as espécies *C. sakazakii*, *C. malonaticus* e *C. dublinensis* em saladas sashimi (peixe cru com arroz e outros ingredientes) adquiridas em varejistas localizados no estado do Rio de Janeiro. Além disso, os autores relataram a contaminação por *C. malonaticus* ST440 em um lote de 33 amostras de água mineral natural de 20 litros vendidas em mercados no Estado do Rio de Janeiro. Brandão *et al.* (2017) conduziram o isolamento, caracterização molecular e fenotípica, bem como a suscetibilidade a antibióticos de *Cronobacter* spp. As espécies *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. dublinensis* e *C. muytjensii* foram isoladas a partir da análise de 90 amostras de alimentos de varejo comercializados no Rio de Janeiro. Esses alimentos incluíram misturas de cereais para crianças acima de seis meses, especiarias, ervas e farinhas. Silva *et al.* (2019) determinaram a prevalência de *Cronobacter* a partir de amostras de aveia e linhaça disponíveis comercialmente no Brasil, em que um total de 56,7% desses alimentos continham *Cronobacter*. Os isolados foram identificados como *C. sakazakii*, *C. dublinensis*, *C. turicensis* e *C. malonaticus*. Um estudo realizado por Brandão *et al.* (2016) analisou derivados lácteos no Brasil, incluindo 90 amostras de queijos (Tipo Minas Frescal, tipo Prato e tipo Prato fatiado). Dentre essas amostras, uma de queijo tipo Minas Frescal apresentou a presença de *Cronobacter*, identificada como *C. sakazakii*. Carvalho *et al.*, 2020 revelou a presença de *C. sakazakii* em amostras de alimentos infantis adquiridas entre 2016 e 2018 no mercado local da cidade de Campinas, São Paulo, Brasil, destacou divergências na identificação dos isolados por diferentes métodos e ressaltou a preocupação com a resistência antimicrobiana nesses patógenos.

Essas pesquisas ressaltam a importância da vigilância e controle da contaminação por *Cronobacter* spp. em diversos alimentos, especialmente aqueles destinados ao consumo de crianças, visando garantir a segurança dos alimentos e a proteção da saúde pública. A resistência antimicrobiana, destacada em estudos recentes, acrescenta uma camada adicional de

preocupação, reforçando a necessidade de estratégias eficazes de monitoramento e prevenção (Zeng *et al.*, 2020).

Em um estudo específico realizado em Teerã, Irã, objetivando investigar cepas de *C. sakazakii*, foi constatada uma prevalência de 6,86%. Essas cepas demonstraram alta resistência a uma gama de antibióticos, incluindo amoxicilina-ácido clavulânico, amoxicilina, ampicilina, cefoxitina, cefepima, eritromicina, ceftriaxona e ciprofloxacina, enquanto se mostraram suscetíveis a gentamicina, tetraciclina, norfloxacina e azitromicina. A detecção do gene blaCTX-M-1 em 96% dos isolados sugere a presença de resistência a cefalosporinas de terceira geração. A diversidade genética entre os isolados foi evidenciada pelo método ERIC-PCR, indicando múltiplos tipos clonais. A correlação significativa entre propriedades genotípicas e fenotípicas de resistência destaca a necessidade premente de sistemas de vigilância microbiana para identificar e controlar cepas multirresistentes de *C. sakazakii*, particularmente em contextos alimentares (Pakbin *et al.*, 2022).

Outro estudo voltado para a determinação da suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *Cronobacter* spp. isoladas de uma planta de produção de leite em pó, mostrou que a coleta de cem amostras na unidade de produção resultou no isolamento e identificação de quinze cepas de *C. sakazakii*, revelando uma taxa de contaminação de 15%. Os resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos indicaram que as cepas de *C. sakazakii* eram sensíveis à piperacilina/tazobactam, ampicilina/sulbactam e amoxicilina/clavulanato, destacando-se, especialmente, a sensibilidade ao meropenem e à cefotaxima (Csorba *et al.*, 2022).

A resistência antimicrobiana, especialmente quando relacionada a múltiplos medicamentos, emerge como uma preocupação significativa em saúde pública, aumentando o risco de tratamentos ineficazes, doença prolongada e maior mortalidade.

3.2 CRESCIMENTO DE *CRONOBACTER* EM DIFERENTES TEMPERATURAS

As espécies de *Cronobacter* desenvolveram adaptações para sua sobrevivência em condições adversas, especialmente nos ambientes de produção de alimentos, e têm o potencial de desencadear infecções graves em hospedeiros suscetíveis (Phair *et al.*, 2022).

Cronobacter spp. têm a capacidade de se desenvolver em fórmulas à base de amido. Portanto, para minimizar o risco de infecções em bebês, é essencial refrigerar essas fórmulas quando não forem consumidas imediatamente (Osaili *et al.*, 2009). A FAO e OMS recomenda a utilização de água a 70°C para diluir fórmulas infantis, com objetivo de reduzir consideravelmente o risco de contaminação por *Cronobacter* spp.. Em geral, os cenários de

maior risco ocorrem quando a fórmula é reconstituída a temperaturas de 40°C e 50°C e não é consumida imediatamente (OMS, 2007).

Estudos determinaram o crescimento de *Cronobacter* em fórmula infantil em pó em diversas temperaturas nos últimos anos. Kandhal *et al.* (2010) pesquisaram a sobrevivência de duas cepas de *Cronobacter* inoculadas em fórmula infantil em pó seco, nas quais foram armazenadas durante 22 semanas em diversas temperaturas entre 7 e 42 °C. As espécies estudadas geralmente sobreviveram melhor a altas temperaturas (37 e 42 °C), enquanto essa diferença na sobrevivência não foi aparente em outras temperaturas. Fang *et al.* (2012) realizaram uma cinética de crescimento e comparação de modelos de *C. sakazakii* em pó reconstituído de fórmula infantil. Os resultados revelaram que, com exceção de temperaturas muito baixas (6°C), *C. sakazakii* mostrou crescimento significativo em todas as temperaturas testadas, variando de 10 a 48°C. Huertas *et al.* (2015) realizaram experimentos com fórmula infantil em pó, intencionalmente inoculada e posteriormente reconstituída em águas a diferentes temperaturas (50, 55, 60, 65, 70°C) e resfriada em taxas diversas, evidenciaram a capacidade de sobrevivência prolongada de *C. sakazakii* nesse meio. Além disso, esses experimentos indicaram que essa bactéria pode proliferar após a reconstituição da fórmula. Ueda (2017) investigou o crescimento e a sobrevivência de várias cepas de *Cronobacter* em diferentes temperaturas, bem como seu comportamento sob altas temperaturas acima de 50°C. Foram analisadas 73 cepas isoladas de vegetais frescos, alimentos secos e solo, incluindo diferentes espécies de *Cronobacter*. Os resultados revelaram que todas as cepas de *Cronobacter* cresceram e se multiplicaram principalmente a 35 e 44°C durante as primeiras 16 horas de incubação. Por outro lado, apresentaram crescimento limitado a 15 °C e não cresceram a 5°C. A 48 °C, as bactérias demonstraram um ligeiro crescimento durante 6 a 8 horas de incubação, mas posteriormente diminuíram ou foram inativadas após 16 horas. O estudo também avaliou a resistência ao calor das cepas em condições de 50, 55, 60, 65 e 70°C. Chauhan *et al.* (2020) investigaram a resistência ao calor de cepas de *C. sakazakii* após serem submetidas a diferentes estresses fisiológicos, incluindo refrigeração (a 4°C por 24 horas), privação de nutrientes (a 37°C por 48 horas) e dessecação (a 25 °C por 4 dias). Os resultados revelaram que a sobrevivência de todas as cepas diminuiu significativamente após a dessecação em comparação com aquelas que não foram submetidas a nenhum estresse (condição controle). No entanto, foi observado que o estresse causado pelo resfriamento aumentou a capacidade de resistência ao calor de todas as cepas em todas as temperaturas testadas (52, 55 e 58 °C).

Estes estudos destacados enfatizam a importância de compreender o comportamento e a multiplicação das cepas de *Cronobacter*, especialmente em fórmulas infantis. As adaptações

dessas bactérias em ambientes adversos, juntamente com sua capacidade de crescimento em fórmulas, ressaltam a necessidade de precaução ao lidar com a preparação e o armazenamento desses alimentos. A refrigeração adequada é fundamental para reduzir o risco de infecções em bebês ou crianças da primeira infância. Além disso, a resistência ao calor de *Cronobacter*, especialmente após a exposição a estresses fisiológicos, destaca a importância de medidas rigorosas de segurança de alimentos. Portanto, garantir a higiene adequada, a temperatura correta e o manuseio cuidadoso das fórmulas infantis é essencial para proteger a saúde das crianças.

Capítulo 2

Ensaio de PCR quantitativo com corantes de viabilidade (vPCR) direcionados a microrganismos de origem alimentar - Prospecção científica (2010–2022)

Artigo publicado na Microchemical Journal (ANEXO A)

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109769>

Autores: Lúcia Mara dos Reis Lemos, Ana Carolina Maisonnave Arisi.

RESUMO

Esta revisão prospectiva tem como objetivo mapear ensaios publicados que utilizaram corantes de viabilidade combinados com qPCR (vPCR) para detectar células viáveis ou a integridade da cápside de patógenos, com foco na análise de alimentos. Estudos no período de 2010 a 2022 foram identificados em bases de dados online. Este estudo prospectivo científico resumiu informações sobre o número de publicações, ensaios de vPCR realizados nos últimos anos e as principais espécies de patógenos transmitidos por alimentos. Ao utilizar os termos de busca ("viability dyes" OR "PMA") AND "quantitative PCR" AND "Foodborne pathogens", foram encontrados 441 documentos, dos quais 288 eram artigos científicos. Dentre os artigos científicos identificados, 58 artigos se referem ao uso de vPCR para detecção de patógenos transmitidos por alimentos. Os trabalhos científicos sobre ensaios de vPCR visam principalmente os seguintes patógenos transmitidos por alimentos: *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* e *Cronobacter sakazakii*, que representam problemas para a segurança de alimentos e saúde pública. Este estudo de prospecção científica resume os desafios para o ensaio de vPCR incluem a otimização da concentração de corante intercalante e condições de exposição à luz para diferentes matrizes alimentares. A interferência de microrganismos não alvo deve ser considerada para amostras de alimentos com carga microbiana elevada.

Palavras-chave: Patógenos de origem alimentar; Propídio de monoazida; qPCR; Viabilidade microbiana.

1 INTRODUÇÃO

Bactérias patogênicas de origem alimentar, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Campylobacter* spp. são causais agentes de doenças transmitidas por alimentos e são considerados um problema de saúde pública em todo o mundo. Em 2021, foram notificados 4.538 surtos de origem alimentar na União Europeia e no Estados Unidos da América, com 41.849 casos, 3.501 hospitalizações e 68 mortes (CDC, 2023a; EFSA, 2023).

No diagnóstico etiológico de doenças transmitidas por alimentos, são utilizadas técnicas bem estabelecidas na microbiologia de alimentos para detectar ou quantificar patógenos alimentares. Tradicionalmente, são empregados meios seletivos e diferenciais, confirmação bioquímica e outros parâmetros para detectar bactérias patogênicas. No entanto, esses métodos são demorados e trabalhosos (Elizaquível; Sánchez; Aznar, 2012). Com o avanço da biologia molecular, os métodos moleculares tornaram-se mais rápidos e seletivos em comparação com os métodos convencionais, permitindo a detecção de patógenos, mesmo na ausência de um meio de enriquecimento seletivo. A introdução da PCR em 1983 foi um marco no desenvolvimento de métodos moleculares para análise de alimentos. Além de economizar tempo e trabalho, a PCR também possui a vantagem de detectar simultaneamente várias espécies de bactérias (Chin *et al.*, 2022; Gao *et al.*, 2021). Ao longo do tempo, essa abordagem evoluiu, adquirindo um caráter quantitativo (qPCR). Como resultado de sua consolidação como uma valiosa ferramenta de pesquisa, foram desenvolvidos diversos trabalhos baseados em qPCR para detectar e quantificar espécies potencialmente patogênicas para os seres humanos em diferentes matrizes alimentares e ambientes de processamento de alimentos (Brauge *et al.*, 2020; Petersen; Ma e Lu, 2021; Telli; Doğruer, 2019).

Uma desvantagem na técnica qPCR é a incapacidade de distinguir células vivas, mortas ou viáveis, mas não cultiváveis, em matrizes complexas e populações bacterianas variadas. Para superar essa desvantagem, o qPCR foi combinado com corantes intercalantes de DNA para permitir a detecção seletiva e a quantificação de patógenos viáveis que contaminam os produtos alimentícios. Na literatura, os primeiros estudos propuseram o corante etídio monoazida (EMA) para amplificação seletiva de DNA a partir de células viáveis do patógeno. Posteriormente, surgiu o propídio monoazida (PMA)-qPCR, tornando os intercaladores ainda mais robustos como agentes capazes de relatar comunidades bacterianas viáveis (Elizaquível; Aznar; Sánchez, 2014).

Numerosos ensaios foram desenvolvidos para detectar células viáveis de vários patógenos transmitidos por alimentos em matrizes de alimentos, incluindo bactérias como *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, resultando em várias faixas de sucesso para superar a detecção de DNA de células mortas (Brauge *et al.*, 2020; Petersen; Ma e Lu, 2021; Randazzo *et al.*, 2018; Telli; Doğruer, 2019; Yang; Badoni; Gill, 2011; Zheng *et al.*, 2015).

2 IMPACTO DA PROSPECÇÃO DE ENSAIOS DE VIABILIDADE qPCR NA DETECÇÃO DE PATOGÊNIOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

Revisões de literatura anteriores foram publicadas sobre corantes intercalantes de DNA e ensaios moleculares baseados em PCR para a detecção de patógenos de origem alimentar, destacando os problemas experimentais e as novas estratégias desenvolvidas para melhorar os ensaios de vPCR (Ceuppens *et al.*, 2014; Elizaquível; Aznar; Sánchez, 2014; Foddai; Grant, 2020; Hameed; Xie; Ying, 2018; Zeng *et al.*, 2016). Os estudos prospectivos mostraram-se uma importante ferramenta para caracterizar o cenário científico na área de microbiologia (Feitosa *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2018). Esta revisão de prospecção visa fornecer uma visão geral dos artigos publicados de 2010 a 2022 usando corante intercalante de DNA (com ênfase no corante PMA) em conjunto com qPCR para a detecção de patógenos viáveis em alimentos.

2.1 FONTES DE INFORMAÇÃO E PESQUISA SOBRE ENSAIOS DE VIABILIDADE DE CORANTES- qPCR

A prospecção científica foi realizada nas bases de dados eletrônicas *Scopus*, *PubMed*, *Web of Science*, *Springer* e *Science Direct* para abranger artigos publicados em 2010-2022. Durante as buscas, foram utilizadas combinações de palavras-chave, selecionando os seguintes termos para tratamento dos dados: "*quantitative PCR*", "*viability dyes*", "PMA" e "*Foodborne pathogens*" (Tabela 2.1). O foco da pesquisa foi obter informações sobre a aplicação de corantes intercalantes de DNA em associação com qPCR para a detecção de patógenos de origem alimentar.

Tabela 2.1 – Escopo da estratégia de busca e número de documentos encontrados em cada banco de dado sobre corantes intercalantes de DNA acoplados a ensaios de qPCR para detecção de células viáveis do patógeno.

Estratégia de pesquisa		<i>Scopus</i>	<i>Science Direct</i>	<i>PubMed</i>	<i>Springer</i>	<i>Web of Science</i>		
“quantitative PCR”		47.213	84.184	32.517	184.930	45.898		
“viability dyes”		199	3.295	45	46.700	55		
“viability dyes”	“quantitative PCR”	7	432	4	11.382	7		
“PMA”	“quantitative PCR”	226	2.337	165	3.187	319		
“viability dyes”	“quantitative PCR”	“Foodborne pathogens”	1	4	1	374	1	
“viability dyes”	PMA	“quantitative PCR”	“Foodborne pathogens”	245	57	1	95	1
Busca selecionada*								
(“viability dyes” OR “PMA”) AND “quantitative PCR” AND “Foodborne pathogens”		298	53	6	110	18		

*Busca selecionada para busca de trabalhos de língua inglesa e acesso aberto, com objetivo de direcionar melhor o resultado proposto

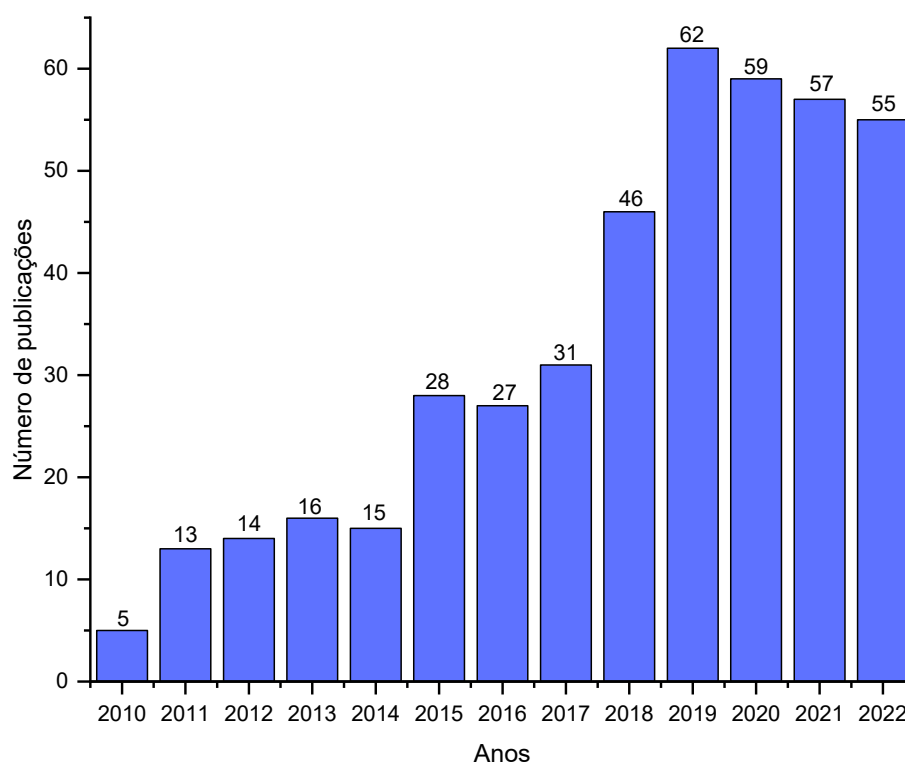
Fonte: Dados da pesquisa.

A busca nas bases de dados apenas com o termo "*quantitative PCR*" resultou em 394.742 documentos. Ao utilizar a estratégia de pesquisa associando o termo "corantes de viabilidade" com "PCR quantitativo", foram obtidas 11.832 publicações. Em seguida, ao adicionar os termos "PMA" e "*Foodborne pathogens*" às strings de busca, houve uma redução significativa no número de documentos. Assim, uma nova busca foi realizada utilizando as quatro palavras-chave: ("*viability dyes*" OR "PMA") AND "*quantitative PCR*" AND "*Foodborne pathogens*", resultando em 485 documentos relevantes para o tema, que foram selecionados para uma análise mais detalhada. A seleção dos artigos da pesquisa seguiu critérios de inclusão e exclusão para uma leitura completa. O critério de inclusão foi a seleção de estudos que utilizaram corantes de intercalação de DNA em conjunto com qPCR para detectar patógenos de origem alimentar em uma matriz alimentar. Os critérios de exclusão foram aplicados quando a pesquisa não utilizou corantes de viabilidade ou qPCR, ou quando não teve aplicação na detecção de patógenos em matrizes alimentares.

3 REVISÃO GERAL DOS ENSAIOS DE VIABILIDADE DYES-qPCR

Pesquisas bibliográficas identificaram um total de 485 documentos em cinco bases de dados: *Scopus* (298), *Science Direct* (53), *Web of Science* (18), *PubMed* (6) e na base *Springer* (110). Após a triagem de duplicatas, 44 foram removidas, resultando em 441 documentos restantes. A última busca eletrônica foi realizada em 22 de janeiro de 2023. O número de publicações científicas apresentou um aumento constante ao longo de 14 anos, com destaque para os anos de 2018, 2019, 2020, 2021 e 2022, que registraram 46, 62, 59, 57 e 55 documentos, respectivamente, evidenciando a relevância do tema nos últimos anos (Figura 2.1).

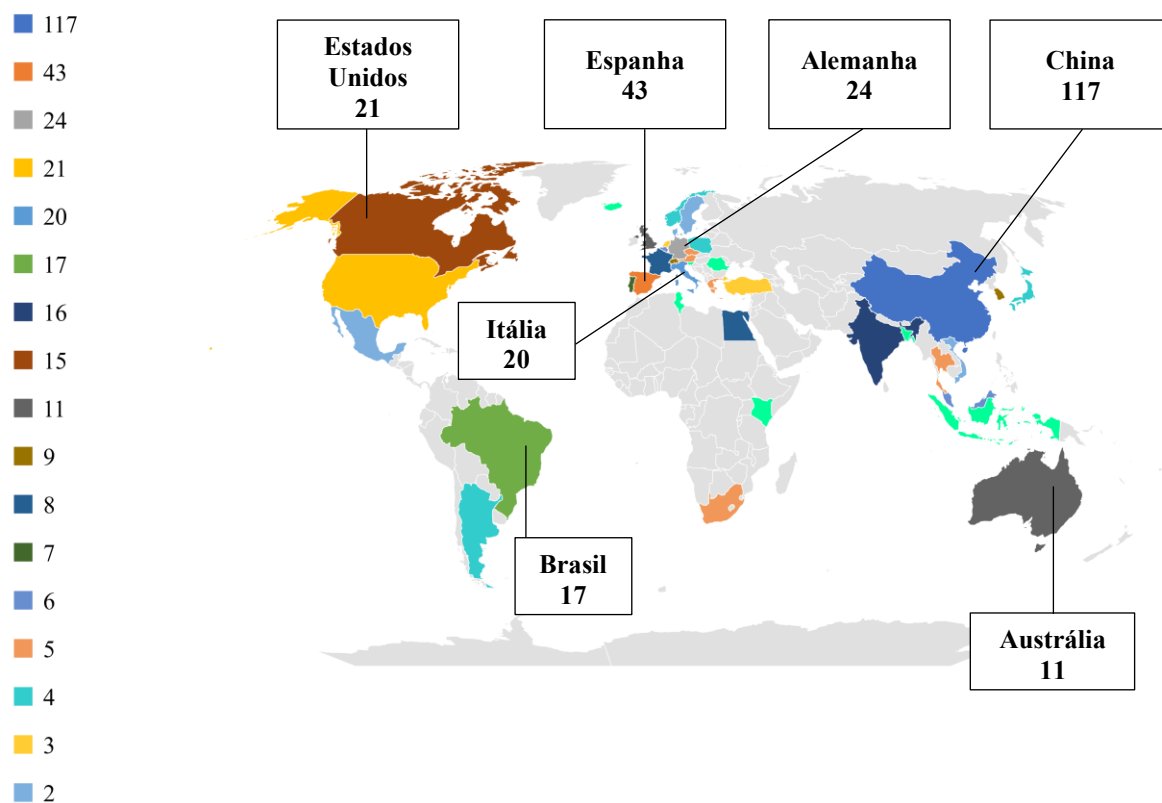
Figura 2.1 – Evolução anual das publicações sobre a utilização de corantes intercalantes de DNA com a técnica de PCR quantitativa.



Fonte: Dados da pesquisa.

Também foi analisada a origem geográfica dos documentos encontrados nas plataformas (Figura 2.2). Observa-se que o maior número de documentos é proveniente da China, com 117 publicações, seguida pela Espanha (43) e Alemanha (24). Também foram identificados documentos dos Estados Unidos da América, Itália, Brasil e Austrália. É importante ressaltar que muitos trabalhos são realizados em colaboração entre autores de diferentes países, portanto, a contagem foi baseada no endereço de todos os autores.

Figura 2.2 – Origem geográfica dos documentos encontrados.

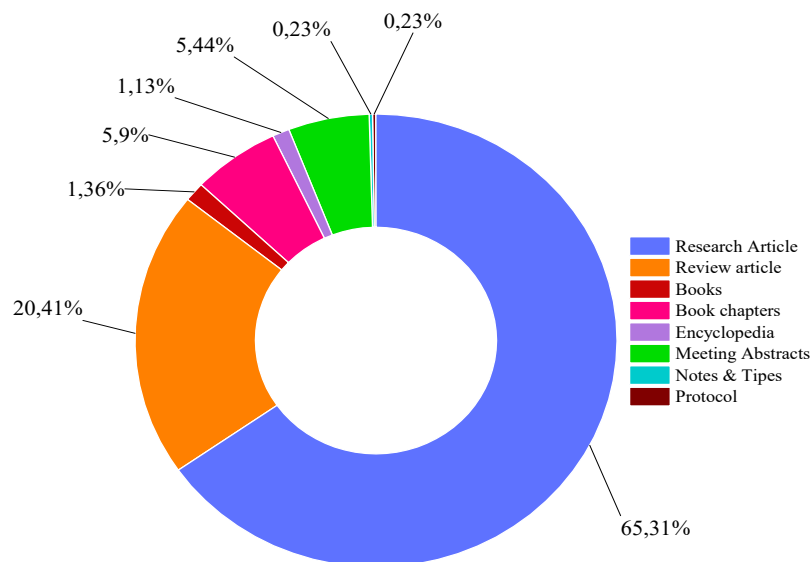


Da plataforma Bing
 © Australian Bureau of Statistics, GeoNames, Geospatial Data Edit, Microsoft, Navinfo, OpenStreetMap, TomTom, Wikipedia

Fonte: Dados da pesquisa.

Foram encontrados 288 artigos de pesquisa (65,30%), 90 artigos de revisão (20,40%), 26 capítulos de livros (5,89%) e 37 outros tipos de documentos (8,39%) (Figura 2.3).

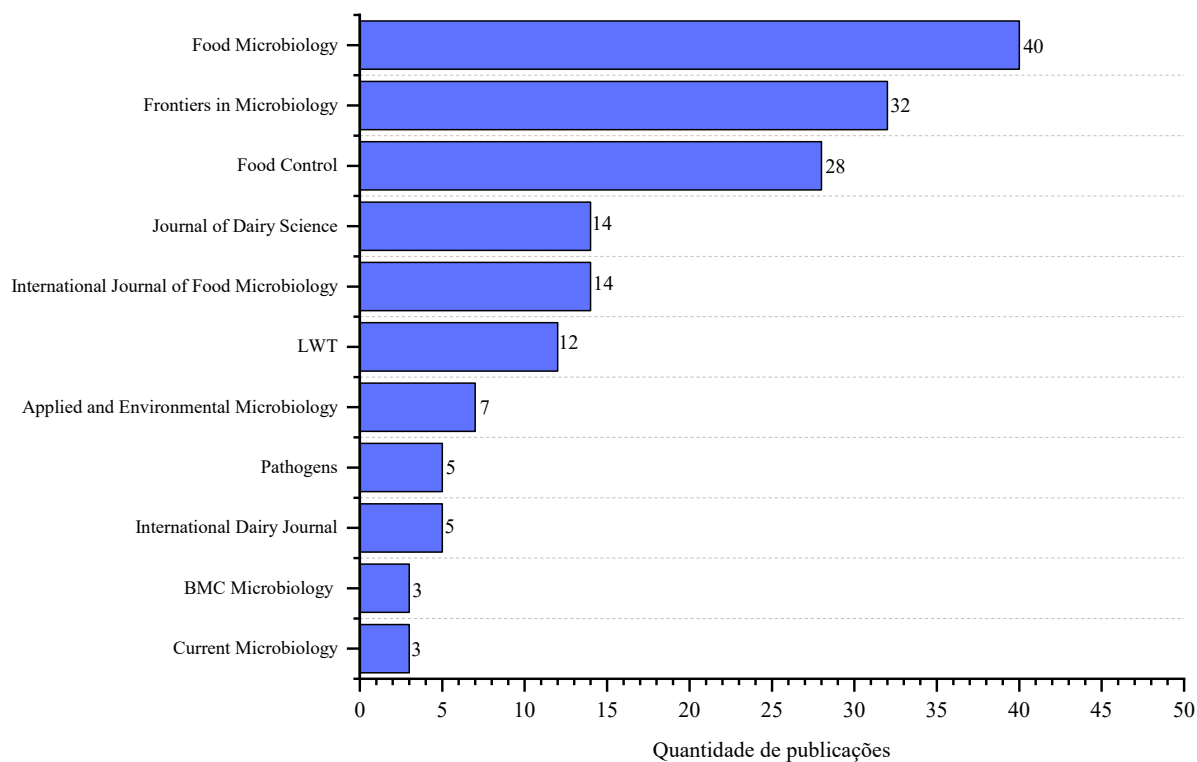
Figura 2.3 – Porcentagem de categorias de publicações na fase de identificação nas bases de dados Scopus, Science Direct, Web of Science, PubMed e Springer.



Fonte: Dados pesquisa.

Os estudos abordaram pesquisas relacionadas a alimentos, solos agrícolas, irrigação, chuva e eficiência de sanitizantes no setor de alimentos. O uso de corantes de viabilidade em conjunto com a qPCR teve um rápido crescimento em diversas áreas, como identificação genética, diagnóstico de doenças e controle de qualidade industrial. Foram identificadas mais de 30 revistas científicas que publicaram artigos sobre esses temas. Os onze periódicos com maior número de artigos foram agrupados e apresentados na Figura 2.4.

Figura 2.4 – Número de publicações sobre o uso de corantes intercalantes de DNA com ensaios quantitativos de PCR por periódicos selecionados nas bases de dados Scopus, Science Direct, Web of Science, PubMed e Springer.



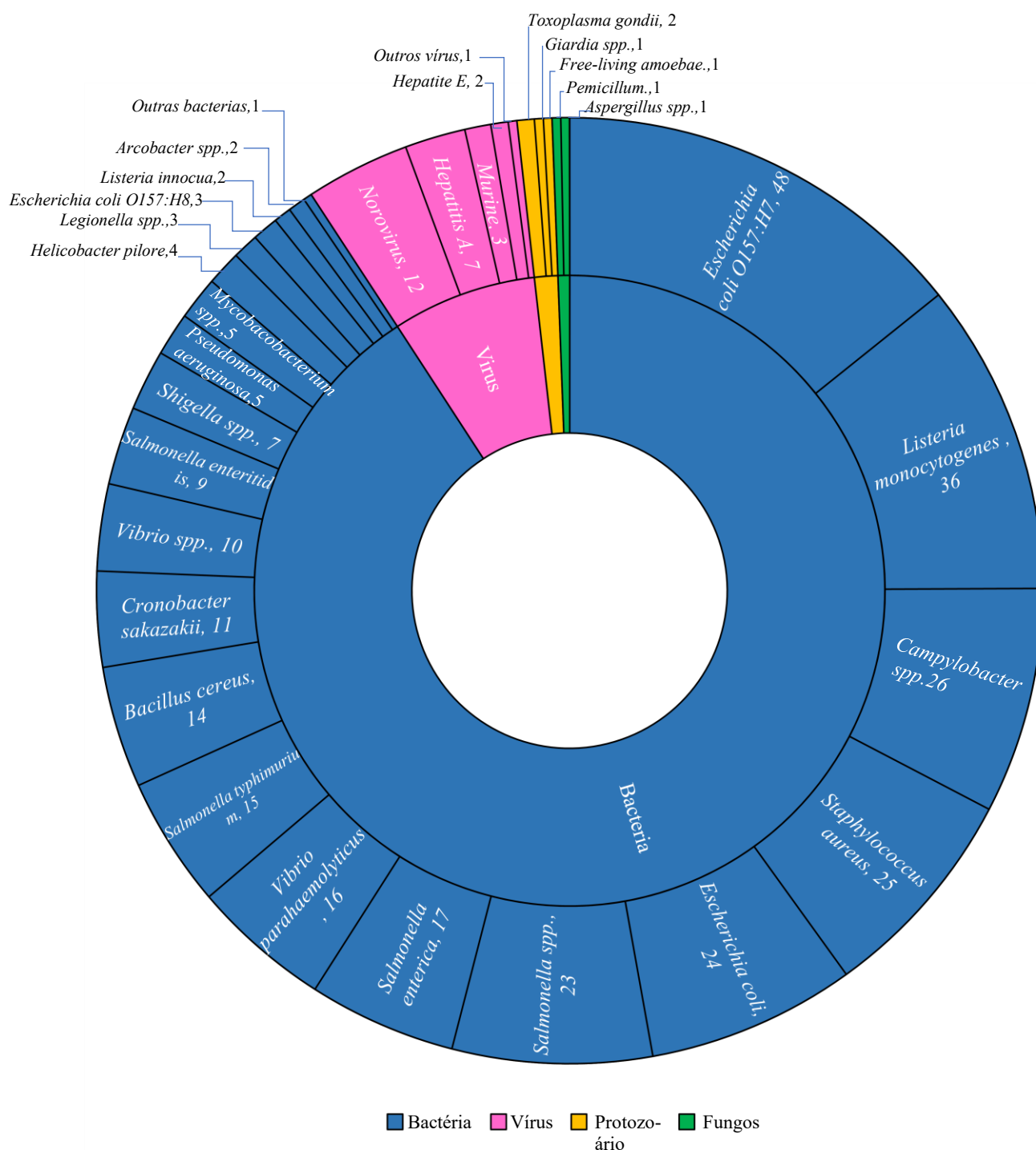
Fonte: Dados pesquisa.

A revista *Food Microbiology* teve o maior número de publicações (40), seguida por *Food Control*, *Frontiers in Microbiology*, *LWT* e *International Journal of Food Microbiology*. Essas revistas internacionais são fontes importantes de informação para profissionais envolvidos no campo da segurança de alimentos, abrangendo tópicos de microbiologia, biotecnologia, química e bioquímica de alimentos. A análise dos dados utilizando o software VOSviewer, com base nos 441 documentos coletados no período de 2010 a 2022, revelou um total de 1.479 palavras-chave. Todas essas palavras-chave foram conectadas umas às outras, formando 7 clusters distintos (Figura 2.5). A rede das principais palavras-chave fornece um resumo dos principais temas abordados nos documentos, incluindo *polymerase chain reaction*, *propidium monoazide*, *food microbiology* e *azide*.

destacaram que até o momento foram comprovadas mais de 100 espécies de microrganismos VBNC em segurança dos alimentos, aplicação ambiental e doenças agrícolas. Leifels *et al.* (2021) mencionaram, com base em um levantamento sistemático sobre vírus, que o PMA e o PMAxx são mais eficientes na remoção de falsos negativos com qPCR do que o corante intercalante EMA para vírus.

Após a leitura do título e resumo de 288 artigos científicos, foi possível agrupar os principais patógenos estudados (Figura 2.6). As bactérias lideraram os objetivos da investigação, destacando-se *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *B. cereus* e *C. sakazakii*. Em relação aos vírus, o norovirus foi objeto de doze estudos, seguido pelo vírus da hepatite A (HAV). Uma revisão sistemática sobre qPCR para monitorar a infecciosidade do vírus no ambiente e nos alimentos mostrou que a maioria dos estudos enfatizou a detecção de norovirus GI e GII junto com o vírus da hepatite A (Leifels *et al.*, 2021). Gêneros fúngicos e alguns protozoários que causam doenças humanas também foram estudados.

Figura 2.6 – Principais microrganismos patogênicos investigados e frequência de ocorrência em publicações selecionadas sobre o uso de corantes intercalantes de DNA com os ensaios quantitativos de PCR.



Nota: Outros vírus: Adenovirus; Astrovirus; Rotavirus; Enterovirus; Tulane (1).
 Outras bactérias: Clostridium perfringens, Proteus mirabilis; Enterococcus; Brucella spp.; Burkholderia cepacia Complex; Candida albicans; Xylella fastidiosa; Bacteroides thetaiotaomicron; Enterococcus faecalis (1).

Foi sistematizado os estudos que aplicaram corantes de viabilidade com PCR quantitativo (vPCR) para detecção de patógenos na matriz alimentar. Os 58 estudos seleccionados foram agrupados de acordo com a matriz alimentar, microrganismo, gene alvo, corante de viabilidade e sua concentração (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Artigos seleccionados sobre corantes intercalantes de DNA acoplados a ensaios de qPCR para detecção de células viáveis de patógenos em diferentes matrizes alimentares.

Matriz alimentar	Microrganismo alvo	Gene alvo	Método, corante concentração e surfactante	Referência
Frango	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter coli</i> <i>Campylobacter lari</i>	<i>16SrRNA</i>	EMA -qPCR 23,81 µM EMA	(Dubovitska <i>et al.</i> , 2023)
Frango	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>16SrRNA</i> <i>uidA</i>	PMA-qPCR 50 µM PMA	(Wulsten <i>et al.</i> , 2022)
Frango	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter coli</i>	<i>16SrRNA</i> <i>ntb2</i> <i>hipO</i> <i>glyA</i>	PMA-qPCR PMA-ddPCR 50 µM PMA	(GovindaswaMy <i>et al.</i> , 2022)
Hambúrguer de carne	<i>Escherichia coli O157</i>	<i>uidA</i>	PMA-qPCR 100 µM PMA	(Rey <i>et al.</i> , 2022)
Frango	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>16SrRNA</i>	PMA-qPCR 25-100 µM PMA _{xx} Ótima 25 µM PMA _{xx}	(Okada <i>et al.</i> , 2022)
Meat rinses	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter sputorum</i>	<i>16SrRNA</i>	PMA-qPCR 0,1 - 50 µM PMA Ótima 50 µM	(Stingl <i>et al.</i> , 2021)

Carne de cordeiro	<i>Campylobacter coli</i>	<i>gly A</i>	PMA-qPCR 50-200 µM PMA Ótima 50 µM	(Lazou <i>et al.</i> , 2021)
Frango	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>rpoB</i>	PMA-qPCR 10- 100 µM PMA Ótima 20 µM PMA	(Lv <i>et al.</i> , 2020)
Carne	<i>Campylobacter coli</i>	<i>gly A</i>	PMA-qPCR com ISPC 50- 200 µM PMA Ótima 50 µM PMA	(Lazou <i>et al.</i> , 2019)
Carne de veado	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>16SrRNA</i>	PMA-qPCR 25 - 100 µM PMA Ótima 50 µM PMA	(Dorn-In; Gareis; Schwaiger, 2019)
Carne	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium perfringens</i> Enterobacteriaceae	<i>16S-</i> <i>23SrRNA</i> <i>groEL</i> <i>cpa</i> <i>rpoB</i>	PMA-qPCR 22,73 µM PMA	(El-Aziz <i>et al.</i> 2018)
Presunto curado seco	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	PMA-qPCR 50 µM PMA	(Ferrentino <i>et al.</i> , 2015)
Presunto assado	<i>Salmonella enterica</i>	<i>ttrA</i>	PMA-qPCR 35, 50, 75, e 100 µM de PMA	(Martin <i>et al.</i> , 2013)

			Ótima 50 µM PMA	
Carne moída	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>uid</i>	PMA-qPCR 10- 200 µM de PMA Ótima 25 µM PMA	(Liu e Mustapha 2014)
Carne e espinafre	<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	PMA-qPCR 50 µM PMA	(Li e Chen 2013)
Carne bovina	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>ORF 3276</i>	PMA-qPCR 50 µM PMA	(Li e Chen 2012)
Salsicha, peixe e frango e leite	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>	PMA-qPCR 22,73 µM PMA	(Zhang <i>et al.</i> , 2015a)
Fórmula infantil em pó	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>gluA</i>	PMAxx-qRPA e PMAxx- qPCR 5–250 µM PMAxxTM Ótima 10 µM PMAxxTM	(Gao <i>et al.</i> 2021)
Fórmula infantil em pó	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>ITS</i>	SD-PMA- qPCR 0,45–22,73 µM PMA Ótima 11,36 µM PMA	(Zhou <i>et al.</i> , 2016)
Derivados do leite	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>hly</i>	PMAxx- LAMP with IAC	(Roumani <i>et al.</i> , 2021)

			25 µM PMA _{xx}	
Leite	<i>Salmonella</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>fimY</i> <i>gltS</i> <i>hlyA</i> <i>MMS</i>	SDS-PMA- qPCR 10- µM PMA Ótima 40 µM PMA	(Qin <i>et al.</i> , 2020)
Leite	<i>Bacillus cereus</i>	<i>cesB</i>	PMA-qPCR 0,23–18,2 µM PMA Ótima 6.82 µM	(Zhou <i>et al.</i> , 2019)
Leite	<i>Escherichia coli</i> 157:H7, <i>Cronobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i> <i>fliC</i> <i>cgcA</i>	SD-PMA- qPCR 11.36–45.46 µM PMA Ótima 22,73 µM PMA	(Liang <i>et al.</i> , 2019)
Leite	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>cfb</i>	SDS-PMA- qPCR 10- 50 µM Ótima concentração 10 µM PMA	(Zhao <i>et al.</i> , 2019)
Leite	<i>Escherichia coli</i>	<i>lacY</i>	SDS-PMA- qPCR with IAC 10- 50 µM de PMA Ótima 40 µM PMA	(Dong <i>et al.</i> 2019)
Leite	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	PMA-qPCR	(Zi <i>et al.</i> , 2018)

			1-100 µM de PMA Ótima 40 µM de PMA	
Leite	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>	SDS-PMA-qPCR with IAC 10- 50 µM PMA Ótima 40 µM PMA	(Dong <i>et al.</i> , 2018)
Leite	<i>Escherichia coli</i> <i>O157:H7 Salmonella enterica serovar Enteritidis</i>	<i>fliC</i> <i>invA</i>	SD-PMA-qPCR 1–34,08 µM PMA Ótima 11,36 µM PMA	(Zhou <i>et al.</i> , 2017)
Leite	<i>Bacillus cereus</i>	<i>hly</i>	PMA-qPCR 4,55–68,18 µM PMA 68,18 µM PMA	(Cattani <i>et al.</i> , 2016)
Leite	<i>Escherichia coli</i> <i>O157:H7</i>	<i>flic</i>	SD-PMA-qPCR 50 µM PMA	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
Sorvete	<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	<i>invA</i>	PMA-qPCR 25 µM PMA	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
Sorvete	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>iap</i>	PMAxx-qPCR 80 µM PMAxx	(Bernardo <i>et al.</i> , 2021)
Alface e espinafre baby	<i>Escherichia coli</i> <i>O157:H7</i>	<i>uidA</i> <i>23S rRNA</i>	EMA e PMAxx-qPCR	(Truchado <i>et al.</i> , 2023)

	<i>Listeria monocytogenes</i>		10 µM EMA e 75 µM PMA	
Alface, tomate e espinafre	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Salmonella enterica</i>	<i>wzy</i> <i>agfA</i>	PMA-qPCR e PMA-LAMP 1-100 µM PMA Ótima concentração 10 µM PMA	(Han <i>et al.</i> , 2020)
Alface, anel de lula, camarão e suco de pêra	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>rfbE</i>	PMA-ddPCR e qPCR 25–200 µM PMA Ótima 50 µM PMA	(Pan <i>et al.</i> , 2020)
Páprica, pimenta em pó e pimenta preta	<i>Aspergillus and Penicilium</i>	ITS	PMA-qPCR 50 µM PMA	(Vyhnánek <i>et al.</i> , 2018)
Alface	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>gapA</i> , <i>rfbE</i> , <i>eae</i> , and <i>lpfA</i>	PMA-qPCR 40 µM PMA	(Ju; Moyne; Marco, 2016)
Tomate	<i>Alternaria spp.</i>	<i>Alt4 – Alt5</i> and <i>Alt6 – Alt7</i>	PMA-qPCR 40 e 65 µM PMA	(Crespo-Sempere <i>et al.</i> , 2013)
Alface e espinafre	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>eae</i> and <i>stx1</i>	PMA-qPCR 50 µM PMA	(Dinu; Bach, 2013)
Alface e soja	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Salmonella</i>	<i>uidA</i> <i>invA</i> <i>hly</i>	PMA-qPCR 50 µM PMA	(Elizaquível; Sánchez; Aznar, 2012)

Ostra crua	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	vp0488- <i>tlh</i>	PMA- qPCR e ddPCR 1-80 µM de PMA Ótima 30 µM PMA	(Zhou <i>et al.</i> , 2023)
Mexilhões	<i>Murine Norovirus</i>	<i>ORF1</i>	PMAxx-RT- qPCR 200- 400 µM PMAxx™ Ótima 300 µM PMAxx™	(Razafimahefa <i>et al.</i> , 2021)
Frutos do mar	<i>Escherichia coli</i>	<i>uidA</i>	PMA-qPCR 20 -80 µM PMA Ótima 50 µM PMA	(Miotto <i>et al.</i> , 2020)
Mexilhões	Human norovirus GII.4	<i>HuNoV</i> <i>GII.4</i>	PMA-RT- qPCR 200 µM PMA	(Jeon <i>et al.</i> , 2020)
Camarão	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i>	SD-PMA- qPCR 10 - 80 µM PMA Ótima 40 µM	(Ling <i>et al.</i> , 2020b)
Camarão	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tlh</i>	PMAxx-qPCR e PMAxx- LAMP 5-100 µM PMA Ótima 15 µM PMA	(Cao <i>et al.</i> , 2019b)

Filé de salmão do Atlântico cru (<i>Salmo salar</i>)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	PMA-qPCR 100 µM PMA	(Barretta <i>et al.</i> , 2019)
Frutos do mar	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tlh</i>	PMA-qPCR 20 µM PMA	(Liu <i>et al.</i> , 2018)
Mexilhões e ostras	Human Norovirus genogroup I genotype 4	-	Triton- PMAxx- qPCR 100 µM PMAxx	(Randazzo <i>et al.</i> , 2018)
Frutos do mar	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>thyA</i>	PMA-qPCR e PMA-LAMP 5- 100 µM PMA Ótima 15 µM PMA	(Zhi <i>et al.</i> , 2018)
Camarão	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>tlh</i> <i>hly A</i>	PMA-qPCR 25- 100 µM PMA Ótima 100 µM PMA	(Zhang <i>et al.</i> , 2015b)
Peixe	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i>	PMA-qPCR e PMA-LAMP 50 µM PMA	(Telli e Dogruer, 2019)
Ovos líquidos	<i>Salmonella enterica</i> serovar Newport <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	<i>invA</i>	PMA-qPCR 1- 20 µM PMA Ótima 5 µM PMA	(Zhang <i>et al.</i> , 2023)
Licor de chocolate, flocos de milho	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>16S rRNA</i>	PMAxx TM - qPCR 50 µM PMA	(Ly <i>et al.</i> , 2020)

e pistache torrado a seco			PMA-qPCR e PMA-LAMP	
Ovos frescos, tomate e carne	<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	2,5–100 µM PMA Ótima 5 µM PMA	(Fang <i>et al.</i> , 2018)
Vegetais	<i>Escherichia coli</i> <i>O157:H7</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>uidA</i> <i>Jhol</i> <i>hly</i>	PMA-qPCR 100 µM PMA	(Elizaquível <i>et al.</i> , 2013)
Amostras de alimentos	<i>Salmonella enterica</i>	<i>invA</i>	PEMAX TM - qPCR 100 µM PEMAX TM	(Thanh <i>et al.</i> , 2017)
Alimentos processados comerciais	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>prfA</i>	PMA-qPCR 50 µM PMA	(Agustí; Fittipaldi; Codony, 2018)
Chá	<i>Salmonella enterica</i> <i>serovar Enteritidis</i> , <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> <i>Salmonella Agona</i> <i>Salmonella Newport</i>	<i>ttrA</i>	PMA-qPCR 5-100 µM PMA Ótima 20 µM PMA	(Shi <i>et al.</i> , 2022)

Abreviações: qRPA: amplificação quantitativa da recombinase polimerase; ddPCR: PCR de gota digital; EMA: monoazida de etídio; IAC: controle de amplificação interna; ISCP: controle interno do processo de amostragem; PMA: propídio monoazida; PMAxxTM: corante de viabilidade (Biotium); PEMAXTM: corante de viabilidade (GenIUL); SD: deoxicolato de sódio; SDS: dodecil sulfato de sódio; Triton: surfactante não iônico.

Duas publicações foram sobre o uso de PMA-qPCR para detecção de fungos (*Aspergillus* e *Penicillium*) em páprica, pimenta em pó e pimenta preta Vyhnánek *et al.* (2018) e Crespo-Sempere *et al.* (2013) quantificaram *Alternaria* spp. contaminação em produtos

derivados do tomate. Três estudos para detecção de vírus (norovirus) em mexilhões e ostras (Jeon *et al.* 2020; Razafimahefa *et al.* 2021; Randazzo *et al.* 2018).

Um total de 53 artigos foram publicados sobre a detecção de bactérias patogênicas em matrizes de alimentos, usando tratamento com corantes intercalantes (PMA e EMA) antes da qPCR. O PMAxx, uma versão melhorada do PMA, teve um bom desempenho como reagente de pré-tratamento para quantificar células viáveis de *Cronobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* (Bernardo *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2019b; Roumani *et al.*, 2021). O tratamento com dodecil sulfato de sódio (SDS) foi proposto para melhorar a eficácia do PMA na diferenciação de células viáveis. Os autores consideraram que um surfactante aniônico pode aumentar a permeabilidade de células mortas ao PMA sem danificar as células viáveis (Qin *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2019).

O uso do intercalador EMA também foi pesquisado. A contaminação de *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* em folhas verdes (alface e espinafre) durante a vida de prateleira foi avaliada usando vPCR e dois corantes, EMA e PMAxx (Truchado *et al.*, 2023). O EMA também foi usado na quantificação de *Campylobacter* spp., embora o EMA-qPCR não tenha obtido resultados consistentes em relação ao método de contagem de colônias. Os autores propuseram que apenas algumas células não viáveis estavam presentes nas amostras coletadas em diferentes estágios da cadeia alimentar de frangos de corte, portanto a adição do corante EMA não forneceu o resultado esperado (Dubovitskaya *et al.*, 2023). Por outro lado, o método PMA-qPCR foi utilizado em amostras comerciais de carne de frango e foi possível detectar com sucesso *Campylobacter* spp. viáveis, incluindo aqueles em estado de VBNC (Okada *et al.*, 2022).

Vários trabalhos utilizaram o PMA para diferenciar células viáveis de *Salmonella* em matrizes alimentares como carne, ovos, leite e alguns tipos de vegetais. O PMA inibiu significativamente a amplificação do gene *invA* em *Salmonella* spp. mortos pelo calor em produtos de ovos líquidos. Uma concentração ótima de PMA de 5 µM foi selecionada em um estudo recente (Zhang *et al.*, 2023). Outros estudos abordaram questões técnicas relacionadas ao uso de PMA-qPCR para detectar células viáveis de *Salmonella* em alimentos. As cepas mais prevalentes incluíram *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovares *Enteritidis* e *Typhimurium* (Elizaquível; Aznar; Sánchez, 2014; Fang *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2022).

PMA-qPCR foi usado para quantificar bactérias *Escherichia coli* O157 viáveis, mas não cultiváveis, de hambúrgueres bovinos contaminados após processamento de alta pressão (REY *et al.*, 2022). Pan *et al.* (2020), além da análise de PMA-qPCR para detecção de *Escherichia coli* O157:H7, utilizou PCR digital de gotículas (ddPCR) com PMA para detectar esse patógeno

em camarão, lula, alface e suco de pera. Han *et al.* (2020) compararam os ensaios PMA-LAMP e PMA-qPCR visando o gene *wzy* em amostras de cultura pura de *E. coli* O157:H7 e produtos frescos, como tomate, alface e espinafre. PMA-LAMP foi mais rápido (30 minutos versus 1 hora) em comparação com PMA-qPCR para quantificação de células *E. coli* O157:H7 VBNC. O uso de PMA e qPCR também foi prático para quantificar *E. coli* O157:H7 em carne moída. O ensaio pode quantificar 105 CFU/g de células vivas na presença de 10⁶ células mortas/g de carne moída (Liu e Mustapha, 2014).

As condições de tratamento com PMA também foram investigadas para *Vibrio parahaemolyticus*. O método PMA-ddPCR foi aplicado para enumerar baixas concentrações de células *Vibrio parahaemolyticus* viáveis em ostra crua e PMA-ddPCR apresentou maior sensibilidade em comparação com PMA-duplex qPCR (Zhou *et al.*, 2023). PMA_{xx}-qPCR e PMA_{xx}-qLAMP foram desenvolvidos e comparados para detectar VBNC de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de camarão, visando o gene alvo *tlh*. O PMA_{xx}-qPCR apresentou maior sensibilidade, sendo mais adequado para a detecção desse patógeno. Este estudo também demonstrou que o tempo total para PMA-qLAMP foi de apenas 45 minutos, enquanto para PMA-qPCR durou 100 minutos, sugerindo que cada método tem suas vantagens (CAO *et al.*, 2019). O PMA-qPCR e o PMA-LAMP foram desenvolvidos para detectar *Vibrio cholerae* em bacalhau, camarão, filé de peixe e manga. O experimento de otimização determinou que a concentração de 15 µM do corante PMA é ideal para este ensaio (ZHI *et al.*, 2018).

4 DESAFIOS PARA DETECÇÃO DE PATOGÊNOS ALIMENTARES POR ENSAIOS DE vPCR

Observamos que as técnicas moleculares baseadas em PCR foram aprimoradas nos últimos treze anos, com 58 artigos consultados sobre ensaios de vPCR desenvolvidos para a quantificação de patógenos viáveis em matrizes alimentares. Os corantes intercalantes EMA, PMA e PMA_{xx} foram usados para diferenciar células vivas, mortas ou comprometidas. Os patógenos de origem alimentar relatados com mais frequência nos estudos foram as bactérias *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* e *Cronobacter sakazakii*, que representam riscos à segurança dos alimentos e à saúde pública.

Um desafio importante é a otimização das condições de exposição à luz do corante intercalante para diferentes amostras de alimentos, uma vez que células e corantes não viáveis

devem estar em uma matriz transparente à luz durante a exposição para a ligação eficiente do corante intercalante às células não viáveis. Outro desafio é estabelecer um método de extração de DNA adequado para matrizes alimentares complexas. Diferenças na estrutura da parede celular entre as espécies, o ambiente do microrganismo dentro da amostra de alimento e outros fatores afetarão a recuperação do DNA. A interferência de microrganismos não-alvo também deve ser considerada em amostras de alimentos contendo alta carga microbiana.

5 CONCLUSÃO

Após décadas de pesquisa, a combinação de corantes de intercalação de DNA com o método de qPCR foi otimizada ao longo do tempo com base nas características distintas das células microbianas e da matriz alimentar. Neste levantamento, informações sobre o tipo de publicações, evolução anual de documentos e principais espécies de patógenos são resumidas por meio de prospecção científica. Os artigos selecionados sugerem que os ensaios de vPCR passaram por procedimentos de otimização, prometendo a enumeração de células viáveis de fungos e bactérias patogênicas, bem como a detecção da integridade da cápside de vírus em alimentos.

Capítulo 3

Conhecimento entre estudantes e profissionais brasileiros sobre patógenos transmitidos por alimentos e métodos de detecção microbiana por PCR: uma pesquisa

Este artigo foi publicado na Journal of Food Safety (ANEXO B)

<https://doi.org/10.1111/jfs.13078>

Autores: Lúcia Mara dos Reis Lemos, Lorena Dutra Silva e Ana Carolina Maisonnave Arisi.

RESUMO

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é amplamente utilizada em diversas áreas de pesquisa e análises laboratoriais de rotina, incluindo a detecção de patógenos de origem alimentar. Nosso objetivo foi investigar o conhecimento sobre métodos baseados em PCR e patógenos transmitidos por alimentos entre estudantes e profissionais brasileiros de graduação e pós-graduação. Uma pesquisa transversal foi realizada usando um questionário online como método de coleta de dados. O questionário foi validado e distribuído por *e-mail* e redes sociais. Foram coletados dados de 1.246 entrevistados. Os escores de conhecimento foram verificados por análise de correspondência e discutidos, 75,8% dos participantes responderam que conheciam algum patógeno veiculado por alimentos e 71,4% dos participantes responderam que não estudaram técnicas de biologia molecular durante a graduação. O maior nível de conhecimento foi encontrado entre os profissionais com mestrado e doutorado. Em conclusão, os participantes não possuem conhecimento sobre métodos baseados em PCR e o nível de formação acadêmica influencia o conhecimento dos fundamentos analíticos. A maioria dos participantes não teve a oportunidade estudar PCR e sua aplicação na detecção de patógenos de origem alimentar durante a graduação. Sugerimos que os cursos de graduação em Engenharia de Alimentos e em Ciência e Tecnologia de Alimentos incluam aulas obrigatórias de biologia molecular em seus programas acadêmicos.

Palavras-chave: Curso de graduação; Aprendizagem; Método molecular; Pesquisa online; Questionário.

1 INTRODUÇÃO

A biologia molecular envolve a pesquisa de ácidos nucleicos e evoluiu do estudo de genes individuais para sistemas biológicos. Técnicas de biologia molecular são usadas em uma ampla variedade de campos; entre eles, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é considerada o padrão-ouro na detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos, devido à sua alta especificidade e sensibilidade (Kralik; Ricchi, 2017; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2020).

Atualmente, métodos baseados em PCR estão disponíveis para a detecção de variabilidade genética, investigação médica ou forense, diagnóstico de doenças infecciosas, mapeamento genético, detecção de microrganismos e autenticação de alimentos, entre outras aplicações essenciais (Agrimonti *et al.*, 2017; Chapela; Garrido-Maestu; Cabado, 2015; Dong *et al.*, 2021; Kim; Kim, 2021).

Ao longo dos últimos anos, a polimerase de DNA e os termocicladores passaram por evoluções significativas, permitindo que a PCR ocorra de maneira adequada, mais rápida e altamente específica, sem comprometer a eficiência e a sensibilidade (Aschenbrenner; Marx, 2017; Kralik; Ricchi, 2017; Wu *et al.*, 2020). A PCR quantitativa (qPCR) é uma técnica utilizada para quantificar a sequência de DNA-alvo, monitorando o processo de amplificação em tempo real, por meio do uso de intercaladores fluorescentes. A qPCR apresenta várias vantagens, como a obtenção rápida dos resultados, o que reduz o risco de contaminação. Por essas razões, ela se tornou uma ferramenta valiosa para pesquisas e de rotina de laboratórios (Chapela; Garrido-Maestu; Cabado, 2015; Umesha; Manukumar, 2018). Na Ciência de Alimentos, a PCR tem sido utilizada em diferentes segmentos de pesquisa, incluindo a segurança dos alimentos desde 1990 (Elmerdahl Olsen, 2000). Os ensaios de PCR têm sido utilizados para a detecção de uma ampla variedade de bactérias, vírus e fungos em alimentos como carnes, aves, peixes, laticínios, fórmulas infantis, vegetais e outros. Esses ensaios moleculares são menos demorados, menos trabalhosos e mais específicos em relação a espécies e cepas do que os métodos clássicos dependentes de cultura microbiológica usados para detecção de patógenos transmitidos por alimentos. Além disso, a identificação de um patógeno específico em amostras de alimentos com baixos níveis desse patógeno e altos níveis de outros microrganismos é facilitada por meio de métodos de PCR em comparação com métodos de cultura (Karaca *et al.*, 2022; Lazou *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2019; Lv *et al.*, 2021; Pan *et al.*,

2020; Scariot *et al.*, 2018; Umesha; Manukumar, 2018; Verruck *et al.*, 2020). Após os avanços recentes nos ensaios moleculares em ciência de alimentos, é essencial que estudantes de ciência de alimentos aprendam sobre a PCR, pois essa técnica tem sido amplamente utilizada na detecção de patógenos transmitidos por alimentos.

A Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA) foi fundada em 1967 (SBCTA, 2022), no mesmo ano em que a Sociedade Brasileira de Bioquímica foi criada, cujo nome foi alterado em 1988 para Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBQ, 2022), quando o campo da Biologia Molecular no Brasil estava em consolidação. Atualmente, o conhecimento das técnicas de biologia molecular tem sido amplamente difundido em várias áreas profissionais e acadêmicas no Brasil, incluindo a ciência e tecnologia de alimentos.

Em 1967, a Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP) criou o primeiro curso brasileiro de graduação em Engenharia de Alimentos. Posteriormente, em 2001, a Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) estabeleceu o primeiro curso brasileiro de graduação em Ciência de Alimentos (Brasil, 2022d). Esses marcos representam uma evolução no acesso aos cursos superiores em diversas áreas acadêmicas no Brasil.

Atualmente, o país oferece um total de 7.022 cursos de doutorado e mestrado, sendo 91 deles na área de Ciência dos Alimentos (Brasil, 2022e). Entre os anos de 2011 e 2020, houve um aumento significativo na oferta de cursos de graduação, passando de 30.420 para 41.953 cursos (Inep, 2020). No momento, as instituições de ensino no Brasil disponibilizam 111 cursos de graduação em Engenharia de Alimentos e 17 cursos de graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, de acordo com o Cadastro Nacional de Cursos e Instituições de Ensino Superior do Ministério da Educação (Brasil, 2022e).

O uso de questionários como método de coleta de dados tem sido usado em pesquisas internacionais entre jovens, estudantes e consumidores para avaliar conhecimentos e interesses específicos (Al-Shabib; Husain; Khan, 2017; Görür; Topalcengiz, 2021; Hakim *et al.*, 2022; Marklinder *et al.*, 2020; Mggibandaba *et al.*, 2020; Ovca; Jevšnik; Raspor, 2014; Reynolds; Jeong; Nam, 2022; Souza; Azevedo; Seabra, 2018). Pesquisas anteriores foram realizadas com a participação de alunos do ensino médio, graduação e pós-graduação, com o objetivo de investigar o entendimento de temas relacionados à biotecnologia e biologia molecular (Chen *et al.*, 2016; Couch; Wood; Knight, 2015; Shi *et al.*, 2010; Southard *et al.*, 2016; Uhl *et al.*, 2021). No entanto, até onde sabemos, nenhuma pesquisa foi realizada abordando a avaliação do nível

de conhecimento entre alunos de graduação e pós-graduação sobre o uso de métodos moleculares usando um questionário como ferramenta de pesquisa. Como o aprendizado sobre métodos baseados em PCR é essencial no ambiente acadêmico, o objetivo do presente estudo foi investigar o conhecimento de métodos baseados em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar entre profissionais, estudantes de graduação e pós-graduação no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PROJETO DE ESTUDO

O presente estudo é uma pesquisa transversal, realizada de fevereiro a abril de 2022, para avaliar o conhecimento de profissionais, estudantes de graduação e de pós-graduação no Brasil, em relação aos métodos baseados em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar.

A estimativa da população de estudo, foi baseada nos estudantes brasileiros com matrículas ativas no ensino superior, segundo o Censo da Educação Superior de 2020, e nos profissionais que disponham de graduação completa, conforme os dados disponibilizados do último censo estatístico brasileiro (IBGE, 2010; INEP, 2020). O tamanho da amostra foi calculado usando *OpenEpi* Versão 3.01 (<http://www.openepi.com>) com intervalo de confiança de 95% (OPENEPI, 2021). A população estimada foi de 15.097.412, resultante da soma de universitários e profissionais com nível superior. Após a realização do plano de amostragem, o tamanho mínimo da amostra total foi de 385 respondentes. Obtivemos um total de 1.246 respondentes das 1.264 respostas recebidas, pois três respondentes não concordaram com os termos do TCLE (APÊNDICE A), onze eram menores de 18 anos e quatro não responderam corretamente à questão de verificação; portanto, não preencheram o formulário na íntegra.

2.2 QUESTIONÁRIO

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com parecer 5.159.538 (ANEXO C). Os autores desenvolveram a pesquisa usando um questionário online e o adaptaram de estudos publicados anteriormente sobre segurança dos alimentos (Osaili *et al.*, 2011; Saeed; Osaili;

Taha, 2021; Soares *et al.*, 2012). O questionário consistia em três seções com 36 perguntas relacionadas às características sociodemográficas dos respondentes, como localização, idade, sexo, formação acadêmica (9 perguntas). As seções 2 e 3 compreendem questões de ciência de alimentos (10 questões) e métodos baseados em PCR (16 questões) e uma questão de verificação (APÊNDICE B).

As questões de conhecimento (um total de 15 questões incluídas nas seções 2 e 3) apresentavam três possibilidades de resposta: "verdadeiro", "falso" e "não sei". Estas questões centraram-se em questões relacionadas com o nível de conhecimento de microrganismos patogênicos de origem alimentar e os procedimentos analíticos de métodos baseados em PCR. O nível de proficiência do respondente foi mesurado por meio da soma dessas 15 questões, utilizando uma escala que varia de 0 a 15 pontos. As respostas corretas valeram 1 ponto, enquanto as respostas incorretas e "não sei" não receberam pontos. Os respondentes que obtiveram pontuação igual ou inferior a nove foram considerados conhecimentos "insuficientes" e aqueles que obtiveram pontuação igual ou superior a 10 pontos (acertos \geq 70%) foram classificados como "suficientes". Os participantes foram classificados de acordo com a escala de pontuação do nível de proficiência com base em estudos sobre segurança dos alimentos e higiene que usaram questionários como ferramenta de avaliação (Low *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2012). O presente questionário foi desenvolvido depois da revisão de literatura de estudos anteriores e após a consulta de quatro especialistas, dois com mestrado em Ciência de Alimentos e experiência em segurança dos alimentos e dois professores com doutorado em Bioquímica e ampla experiência no ensino de biologia molecular. Os especialistas foram solicitados quanto à aparência, validade de conteúdo dos questionários e tradução das declarações da pesquisa para o português. Os especialistas também foram solicitados a revisar declarações e perguntas para garantir palavras apropriadas e compreensão de todas as seções.

2.3 COLETA DE DADOS

O público-alvo foram estudantes de graduação e pós-graduação e profissionais com formação superior em todas as áreas de formação. Para sua abordagem, foi disponibilizado o formulário do questionário online via e-mail, redes sociais (*Facebook*, *Instagram* e *LinkedIn*) e *WhatsApp*. A fim de divulgar à pesquisa, foi realizado um levantamento prévio de endereços eletrônicos públicos de professores e coordenadores de cursos de graduação e pós-graduação

em sites oficiais de instituições de ensino superior dos estados brasileiros, totalizando 20.668 contatos. As pessoas alcançadas pela pesquisa também foram convidadas a compartilhá-la com sua lista de contatos.

No convite para divulgação da pesquisa, foi disponibilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), contendo informações referentes à pesquisa e esclarecimentos sobre a total confidencialidade dos dados, elaborado conforme a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012 (Brasil, 2012). Após concordar com os termos do TCLE, os participantes tiveram acesso ao questionário online (através do Google®Forms).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada, por meio do uso da estatística descritiva (frequências, porcentagens) para sintetizar as características dos respondentes. O nível de conhecimento foi categorizado como "suficiente" ($\geq 70\%$ corretos) ou "insuficiente" ($< 70\%$ corretos).

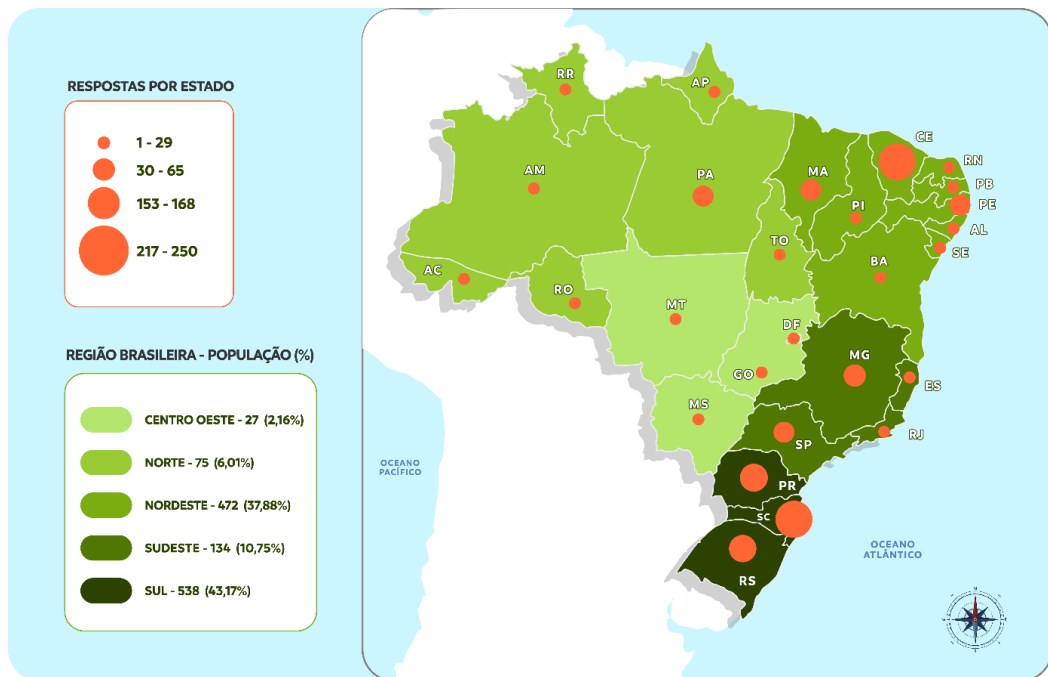
Foi realizado o teste Qui-quadrado (χ^2) para verificar associação entre as variáveis das características gerais dos participantes que foram categorizados com conhecimento “suficiente” e “insuficiente”, nas questões de conhecimento sobre os métodos baseados em PCR na detecção de patógenos de origem alimentar. Resultados com valor de $p < 0,05$, foram considerados estatisticamente significativos. O teste estatístico foi realizado no software *Statistica 7* (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES

O Brasil é uma federação de vinte e seis estados e o Distrito Federal e nossa pesquisa abrangeu todo o território brasileiro (Figura 3.1).

Figura 3.1– Número de respostas por estados brasileiros.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os perfis socioeconômicos dos respondentes da pesquisa online foram compilados (Tabela 3.1). Observamos que 70,8% eram estudantes e profissionais do sexo feminino, e a maioria (32,5%) tinha entre 25 e 35 anos. Os resultados indicaram que o perfil educacional dos respondentes foi dividido em graduação (15,0%), especialização (12,2%), mestrado (15,9%) e doutorado (25,9%). A maioria (30%, n=383) dos participantes eram alunos de graduação em diferentes etapas de seus cursos. Ciências Agrárias (31,6%) e Ciências da Saúde (16,5%) compuseram o primeiro e o segundo maior percentual dos cursos respondentes. A pesquisa foi disponibilizada ao público de todas as áreas dos cursos acadêmicos, visando colher diferentes respostas quanto ao conhecimento do tema proposto de nosso estudo. Assim, algumas contribuições das áreas de Linguística, Letras e Artes, Ciências Sociais Aplicadas e Ciências Humanas também foram coletadas neste estudo.

Tabela 3.1 – Características (gênero, idade e educação) dos profissionais, estudantes de graduação e pós-graduação no Brasil.

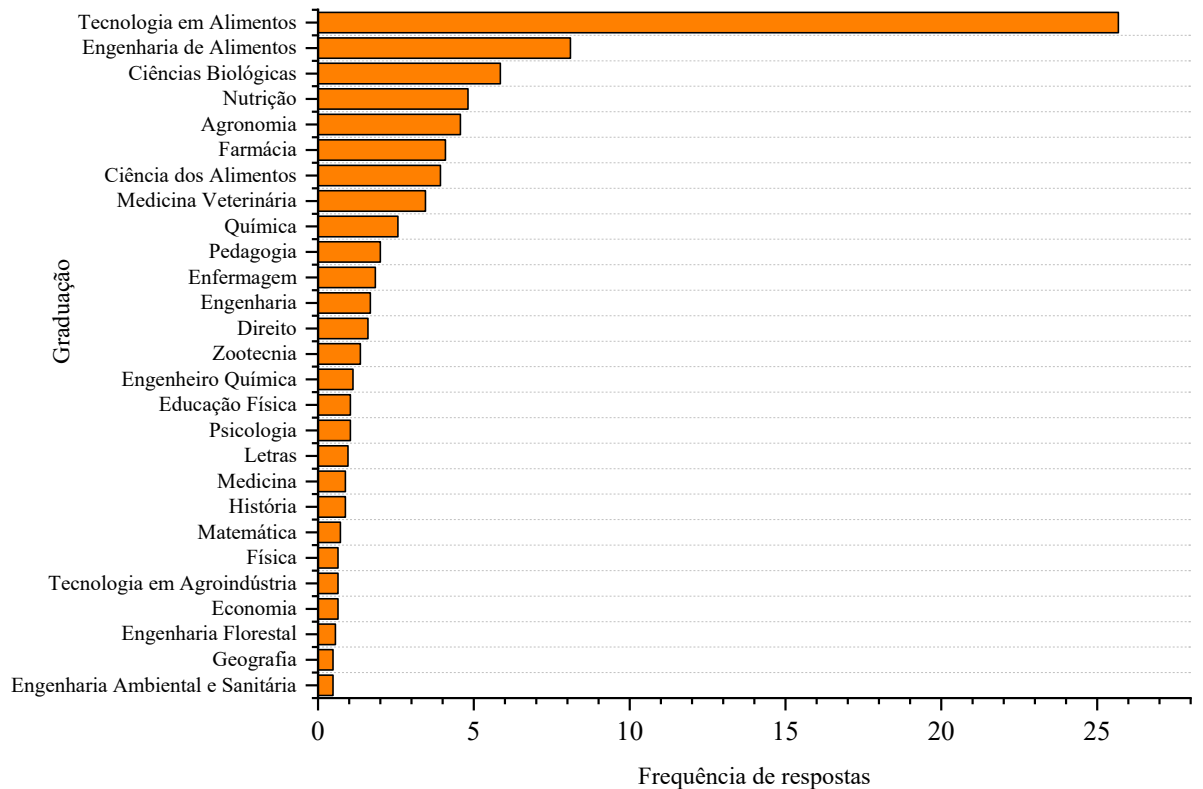
Características	n	%
<i>Gênero</i>		
Feminino	883	70,8
Masculino	359	28,8
Prefiro não dizer	2	0,1
Outros	2	0,1
<i>Idade (anos)</i>		
18 a 25 anos	388	31,1
26 a 35 anos	405	32,5
36 a 45 anos	230	18,4
46 a 55 anos	156	12,5
Acima de 56 anos	67	5,3
<i>Formação acadêmica</i>		
Graduação incompleta	383	30,7
Graduação completa	188	15,0
Especialização	153	12,2
Mestrado	199	15,9
Doutorado	323	25,9
<i>Área de formação</i>		
Ciências Exatas e da Terra	150	12,0
Ciências Biológicas	129	10,3
Engenharias	136	10,9
Ciências da Saúde	206	16,5
Ciências Agrárias	394	31,6
Linguística, Letras e Artes	39	3,1
Ciências Sociais Aplicadas	96	7,7
Ciências Humanas	96	7,7
<i>Período de formação</i>		
1° ao 3° semestre	116	9,3
4° ao 5° semestre	91	7,3
6° ao 7° semestre	76	6,0
7° ao último semestre	123	9,8
Já concluí	840	67,4

Fonte: Dados da pesquisa.

Diferentes perfis profissionais foram identificados e os mais citados foram agrupados (Figura 3.2). A maioria dos entrevistados possui graduação ou está cursando Tecnologia de Alimentos (25,6%), Engenharia de Alimentos (8,1%), Ciências Biológicas (5,8%), Ciência de Alimentos (3,9%) e Medicina Veterinária (3,4%), cursos que se enquadram no áreas de Ciências Agrárias, Ciências Biológicas e Engenharia. No ramo de Ciências da Saúde, os respondentes dos cursos acadêmicos de Nutrição, Farmácia, Enfermagem e Medicina apresentaram 4,8%,

4,0%, 1,8% e 0,8% de respostas, respectivamente. Na área de Ciências Exatas e da Terra, também estiveram representados os cursos superiores de Química (2,57%), Matemática (0,7%) e Física (0,64%).

Figura 3.2 – Número de respostas dos cursos de ensino superior no Brasil.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os respondentes tiveram acesso ao questionário online por e-mail (43,6%), *Instagram* (36,7%), *WhatsApp* (16,9%), *Facebook* (0,8%) e outros meios (1,7%).

3.2 CONHECIMENTO GERAL SOBRE PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR

Em relação ao conhecimento sobre microbiologia, 64,2% dos participantes realizaram aulas de microbiologia e 32,1% responderam “não” (Tabela 3.2), 94,3% relataram que sabem o significado de intoxicação alimentar, aqueles que responderam “sim” foram questionados

sobre o correto definição de intoxicação alimentar, em que 61,5% indicaram a resposta mais adequada de acordo com o significado do Ministério da Saúde (Brasil, 2022a).

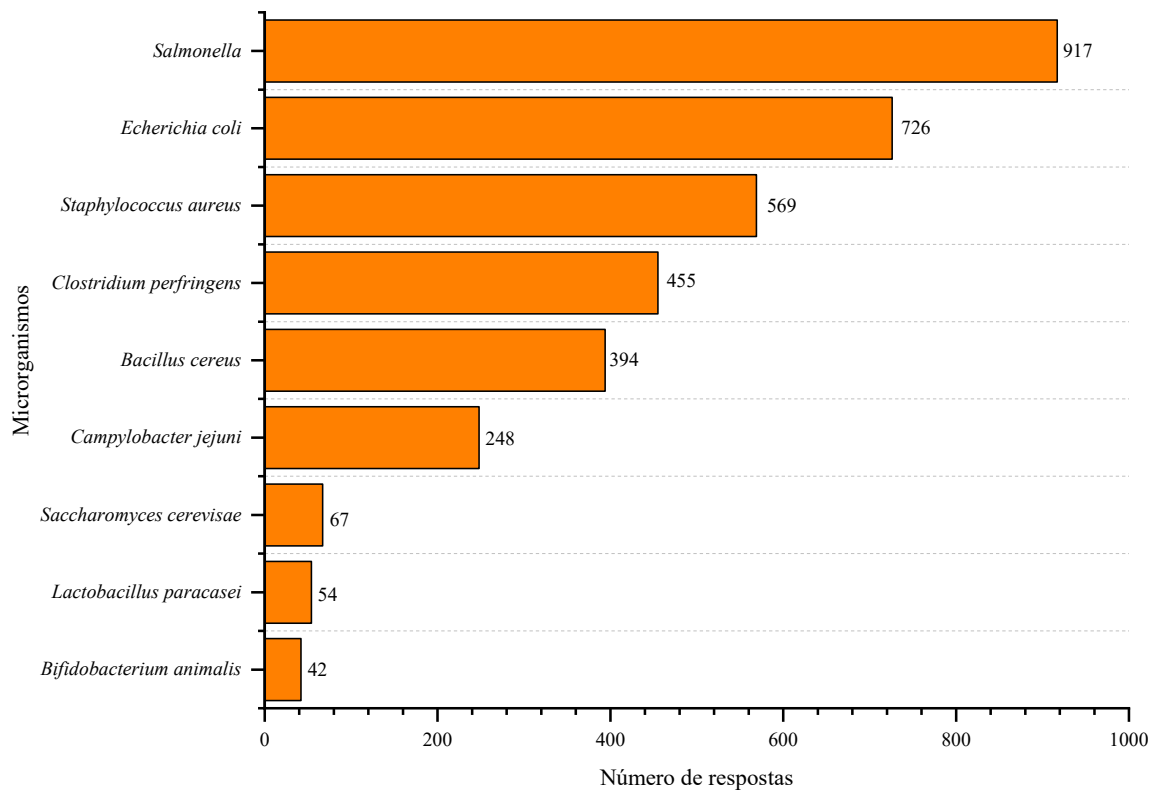
Tabela 3.2 – Frequência e percentual de respostas sobre questões de microbiologia, intoxicação alimentar e patógenos de origem alimentar de estudantes e profissionais no Brasil.

Perguntas	n	%
<i>Você cursou ou está cursando a disciplina de microbiologia?</i>		
Sim, estou cursando	44	3,5
Sim, já cursei	801	64,2
Não	401	32,1
<i>Você sabe o que significa intoxicação alimentar?</i>		
Sim	1176	94,3
Não	70	5,6
<i>Se você marcou sim, assinale o que caracteriza intoxicação alimentar.</i>		
Ocorre por meio da ingestão de um alimento que contenha organismos prejudiciais à saúde.	104	8,3
Ocorre quando uma pessoa ingere alimentos com substâncias tóxicas, incluindo as toxinas produzidas por microrganismos, como bactérias e fungos.*	767	61,5
Ocorre pela ingestão de alimentos que apresentam organismos prejudiciais à saúde e que liberam substâncias tóxicas no organismo.	305	24,4
<i>Você conhece um patógeno de origem alimentar?</i>		
Sim	945	75,8
Não	301	24,1

Fonte: Dados da pesquisa. *O texto em negrito é a opção de resposta ideal.

Quando questionados se conheciam algum patógeno de origem alimentar, 75,8% dos participantes responderam “sim”. Assim, recebiam uma questão para assinalar os microrganismos patogênicos de seu conhecimento, na qual podiam assinalar mais de uma opção (Figura 3.3). *Salmonella* (n=917) foi o patógeno mais citado, seguido por *Escherichia coli* (n=726) e *Staphylococcus aureus* (n=569). Microrganismos benéficos também foram erroneamente identificados pelos respondentes como patógenos de origem alimentar, tais como *Saccharomyces cerevisiae* (n=7), *Lactobacillus paracasei* (n=54) e *Bifidobacterium animalis* (n=42). Isso sugere que a nomenclatura e as funcionalidades de alguns microrganismos ainda são desconhecidas por estudantes e profissionais do ensino superior.

Figura 3.3– Microrganismos de origem alimentar mais citados pelos brasileiros profissionais, alunos de graduação e pós-graduação.



Fonte: Dados da pesquisa.

3.3 CONHECIMENTO SOBRE MÉTODOS BASEADOS EM PCR

A maioria (71,4%) dos participantes respondeu que não estudou técnicas de biologia molecular (Tabela 3.3). Consequentemente, a maioria dos respondentes (65,4%) não soube citar uma técnica na área de biologia molecular. A porcentagem de 34,5% que respondeu "sim" à pergunta anterior recebeu uma pergunta solicitando a menção de algumas técnicas de biologia molecular. As técnicas mais citadas foram PCR, RT-PCR e eletroforese.

A pontuação média no conhecimento foi de 7,5 ($\pm 0,22$), equivalente a 50,2% de acertos. Quando analisamos esse resultado de acordo com a pontuação estabelecida em nosso estudo, o conhecimento geral dos participantes foi considerado "insuficiente", pois a pontuação foi inferior a 10 pontos ($\geq 70\%$ de precisão). As questões que receberam os menores escores foram aquelas voltadas para métodos baseados em PCR, nas quais a pontuação média de dez questões ficou em torno de 4,0 ($\pm 0,10$). Quando questionados se entendiam como funciona o

método baseado em PCR, 58,2% indicaram que não entendiam a técnica. Uma escala de 1 a 5 foi fornecida para medir uma pontuação de conhecimento sobre o método baseado em PCR, em que 1 correspondeu a "sem entendimento" e 5 "muito entendimento". Os participantes que indicaram "pouco entendimento" correspondem a 42,2% para a escala 2, e apenas 4,3% responderam "muito entendimento".

Em relação à pergunta "*Onde você ouviu falar do método PCR?*" (Tabela 3.3), as fontes de informação mais citadas foram as aulas da graduação (28,3%) e o teste de Covid-19 (25,8%), seguidas das aulas da pós-graduação (14,0%), notícias da mídia (12,5%), artigo (4,9%) e aulas do ensino médio (3,9%). Mais de dez por cento responderam que nunca tinham ouvido falar sobre o procedimento analítico.

Tabela 3.3 – Número e porcentagem de respostas sobre técnicas de biologia molecular e reação em cadeia da polimerase (PCR) de profissionais e estudantes no Brasil.

Perguntas	n	%
<i>Na sua graduação você estudou sobre técnicas de biologia molecular?</i>		
Sim	356	28,5
Não	890	71,4
<i>Você sabe citar uma técnica de biologia molecular?</i>		
Sim	430	34,5
Não	816	65,4
<i>Você entende sobre o funcionamento do método de PCR?</i>		
Sim	520	41,7
Não	725	58,2
<i>Em uma escala de 1 a 5, indique qual é o seu nível de entendimento sobre o método de PCR.</i>		
1-Nenhum entendimento	356	28,5
2-Pouco entendimento	526	42,2
3-Moderado entendimento	279	22,3
4-Muito entendimento	54	4,3
5-Muitíssimo entendimento	5	0,4
<i>Em qual local você foi informado sobre o método de PCR?</i>		
Na escola durante o ensino médio	49	3,9
Durante a graduação	353	28,3
Durante a pós-graduação	175	14,0
Notícias através dos meios de comunicação, tais como internet, jornal, internet, TV e rádio	156	12,5
Artigo científico	62	4,9
No teste de Covid-19	322	25,8
Nunca ouvir falar	129	10,3

Fonte: Dados da pesquisa.

Considerando seu conhecimento sobre o princípio da PCR (Tabela 3.4), a maioria dos entrevistados (56,9%) marcou “não sei” na afirmação “*Milhões de cópias de um fragmento podem ser obtidas a partir de um molde de DNA em ciclos sucessivos durante a técnica de PCR execução*”. No entanto, a minoria dos respondentes (34%) marcou “não sei” na afirmação “*O princípio da técnica de PCR é baseado em ciclos de síntese de DNA, cada ciclo consiste em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão*”.

Em relação ao nível de conhecimento dos participantes sobre métodos de detecção de patógenos de origem alimentar (Tabela 3.4), as respostas corretas foram escolhidas pela maioria dos entrevistados (acima de 50%). Em relação à afirmação “*A análise microbiológica por meio de semeadura em meio de cultura é a forma mais rápida e menos trabalhosa de detectar bactérias patogênicas em alimentos*”, cerca de 39,5% dos respondentes não souberam se é verdadeiro ou falso e 33,70% dos entrevistados marcaram a resposta enganosa (Tabela 3.4). A maioria dos participantes (86,4%) sabia que “*Os microrganismos patogênicos de origem alimentar têm efeitos nocivos à saúde humana*”. Cerca de 15,1% dos entrevistados não sabiam que “*Microrganismos patogênicos podem causar a morte entre humanos com baixa imunidade*” e 2,1% marcaram como falso para esta questão.

Tabela 3.4 – Pontuação de avaliação de conhecimento de detecção de patógenos de origem alimentar usando técnicas baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR).

Perguntas	n	%
<i>Microrganismos patogênicos de origem alimentar tem efeitos prejudiciais à saúde humana</i>		
Verdadeiro	1077	86,4
Falso	29	2,3
Não sei	140	11,2
<i>Pessoas saudáveis podem ser portadoras de patógenos que podem causar doenças transmitidas por alimentos.</i>		
Verdadeiro	809	64,9
Falso	166	13,3
Não sei	271	21,7
<i>Microrganismos patogênicos podem causar morte entre seres humanos com imunidade baixa.</i>		
Verdadeiro	1030	88,6
Falso	27	2,1
Não sei	189	15,1
<i>Os microrganismos patogênicos que causam doenças podem ser detectados por análises microbiológicas em laboratório.</i>		
Verdadeiro	1149	92,2

Falso	2	0,1
Não sei	95	7,6
<i>A análise microbiológica utilizando semeadura em meio de cultivo é a forma mais rápida e menos trabalhosa de detectar bactérias patogênicas em alimentos.</i>		
Verdadeiro	420	33,7
Falso	333	26,7
Não sei	493	39,5
<i>Os patógenos que contaminam os alimentos podem ser detectados a partir de pequenas quantidades de DNA.</i>		
Verdadeiro	752	60,3
Falso	56	4,4
Não sei	438	35,1
<i>A amplificação de DNA pela reação em cadeia da DNA polimerase, também conhecida como técnica de PCR, pode detectar patógenos em alimentos.</i>		
Verdadeiro	689	55,2
Falso	33	2,6
Não sei	524	42,0
<i>O princípio da técnica de PCR baseia-se em ciclos de síntese de DNA, onde cada ciclo é constituído por três etapas, denominadas de desnaturação, anelamento e extensão.</i>		
Verdadeiro	780	62,6
Falso	42	3,3
Não sei	424	34,0
<i>A revelação dos resultados da técnica de PCR convencional, pode ser feita por eletroforese em gel de agarose.</i>		
Verdadeiro	397	31,8
Falso	42	3,3
Não sei	807	64,7
<i>A técnica de PCR apenas pode detectar a bactéria Escherichia coli em alimentos cárneos.</i>		
Verdadeiro	88	7,0
Falso	464	37,2
Não sei	694	55,6
<i>A Taq DNA polimerase é uma enzima termoestável utilizada na técnica de PCR convencional.</i>		
Verdadeiro	332	26,6
Falso	32	2,5
Não sei	882	70,7
<i>Milhões de cópias de um fragmento podem ser obtidas a partir de um DNA molde em sucessivos ciclos durante a execução da técnica de PCR.</i>		
Verdadeiro	518	41,5
Falso	19	1,5
Não sei	709	56,9
<i>A técnica de PCR quantitativa (qPCR) é uma técnica usada não só na detecção qualitativa, mas também na quantificação do DNA de patógenos em alimentos.</i>		

Verdadeiro	448	35,9
Falso	53	4,2
Não sei	745	59,7
<i>A reação em cadeia da DNA polimerase permite à amplificação in vitro de pequenas quantidades de DNA de patógenos de origem alimentar.</i>		
Verdadeiro	471	37,8
Falso	29	2,3
Não sei	746	59,8
<i>PCR em tempo real é um sistema que detecta e quantifica determinado fragmento de DNA presente em uma amostra de alimentos.</i>		
Verdadeiro	705	56,5
Falso	48	3,8
Não sei	705	57,0

Fonte: Dados da pesquisa. O texto em negrito corresponde à opção de resposta ideal.

Quando questionados sobre técnicas baseadas em PCR, 60,3% responderam corretamente que patógenos alimentares podem ser detectados a partir de pequenas quantidades de DNA (Tabela 3.4). Cerca de metade dos participantes (55,2%) indicou corretamente que os patógenos podem ser detectados por meio da amplificação do DNA. Um total de 62,6% dos entrevistados marcou a resposta correta de que a PCR é baseada em ciclos térmicos de síntese de DNA de desnaturação, anelamento e extensão. No entanto, 37,2% dos entrevistados indicaram erroneamente que a PCR só poderia detectar a bactéria *Escherichia coli* na carne, e 55,6% não souberam responder. Os participantes estavam menos cientes de que a enzima Taq DNA polimerase é usada na técnica de PCR convencional, em que apenas 26,6% responderam corretamente. Cerca de 56,9% não sabiam que os milhões de cópias de um fragmento de DNA podem ser obtidos a partir de um molde de DNA em ciclos sucessivos durante a PCR.

Quanto ao conhecimento de que a técnica de PCR quantitativa (qPCR) é utilizada não só na detecção qualitativa, mas também na quantificação de DNA de patógenos alimentares, 59,7% dos participantes afirmaram não saber dessa informação. Apenas 37,8% indicaram corretamente que a reação em cadeia da polimerase do DNA permite a amplificação *in vitro* de vestígios de DNA de patógenos transmitidos por alimentos. Cerca de 57,0% dos entrevistados não sabiam que a técnica de PCR em tempo real é um sistema capaz de detectar e quantificar um determinado fragmento de DNA presente em uma amostra de alimento.

3.4 Associação entre conhecimentos dos participantes sobre detecção de patógenos de origem alimentar por técnicas baseadas em PCR

Através da análise do qui-quadrado, foi feita uma associação entre o escore total de conhecimento de técnicas baseadas em PCR para detectar patógenos de origem alimentar e as características demográficas de alunos de graduação, pós-graduação e profissionais no Brasil (Tabela 3.5). Os resultados não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) na pontuação entre os sexos dos participantes. Os entrevistados com idades entre 26-35 e 36-45 anos tinham significativamente mais conhecimento sobre microrganismos patogênicos e técnicas baseadas em PCR do que outras faixas etárias ($p < 0,05$, teste do qui-quadrado).

Significativamente, o maior escore de conhecimento foi encontrado entre os profissionais com doutorado. Estudantes que ainda não concluíram o curso de graduação apresentaram maiores notas insatisfatórias em relação aos outros níveis de ensino. Essa diferença significativa foi identificada quando observado o período acadêmico, em que aqueles que concluíram o ensino superior tinham mais conhecimento sobre esses temas. Observou-se que os participantes dos cursos de ciências agrárias e de ciências biológicas obtiveram escores significativamente mais elevados do que os das demais disciplinas ($p < 0,05$, teste do qui-quadrado).

Tabela 3.5 – Associação entre características demográficas e total conhecimento (satisfatório/insatisfatório) sobre patógenos transmitidos por alimentos e à base de reação em cadeia da polimerase (PCR) técnicas de estudantes brasileiros e profissionais com ensino superior.

Variável: características dos participantes	Conhecimento		Valor $p < 0,05$
	Satisfatório	Insatisfatório	
<i>Gênero</i>			
Feminino	318	565(-)	0,62
Masculino	237(+)	122(-)	
Prefiro não dizer	1(-)	1(+)	
Outros	2(+)	0(-)	
<i>Idade (anos)</i>			
18 a 25 anos	108 (-)	280 (+)	0,00*
26 a 35 anos	172 (+)	233(-)	
36 a 45 anos	98(+)	132(-)	
46 a 55 anos	44(-)	112(+)	
Acima de 56 anos	19(-)	48(+)	

<i>Formação acadêmica</i>			
Graduação incompleta	103(-)	280(+)	
Graduação completa	69(+)	119(-)	
Especialização	42(-)	111(+)	0,00*
Mestrado	79(+)	120(-)	
Doutorado	148(+)	175(-)	
<i>Área de formação</i>			
Ciências Exatas e da Terra	38(-)	112(+)	
Ciências Biológicas	78(+)	51(-)	
Engenharias	31(-)	105(+)	
Ciências da Saúde	74(+)	132(-)	
Ciências Agrárias	203(+)	191(-)	0,00*
Linguística, Letras e Artes	3(-)	36(+)	
Ciências Sociais Aplicadas	3(-)	93(+)	
Ciências Humanas	11(-)	85(+)	
<i>Cursando o nível superior</i>			
1° ao 3° semestre	18(-)	98(+)	
4° ao 5° semestre	26(-)	65(+)	
6° ao 7° semestre	24(-)	52(+)	0,00*
7° ao último semestre	43	80(+)	
Já concluí	330(+)	510(-)	

(*): Indica diferença estatística significativa (valor de $p < 0,05$) pelo teste Qui-quadrado (χ^2) de Pearson. (+) ou (-): Efeito do qui-quadrado por célula, que indicam que o valor observado é superior ao valor teórico esperado ($p < 0,05$).

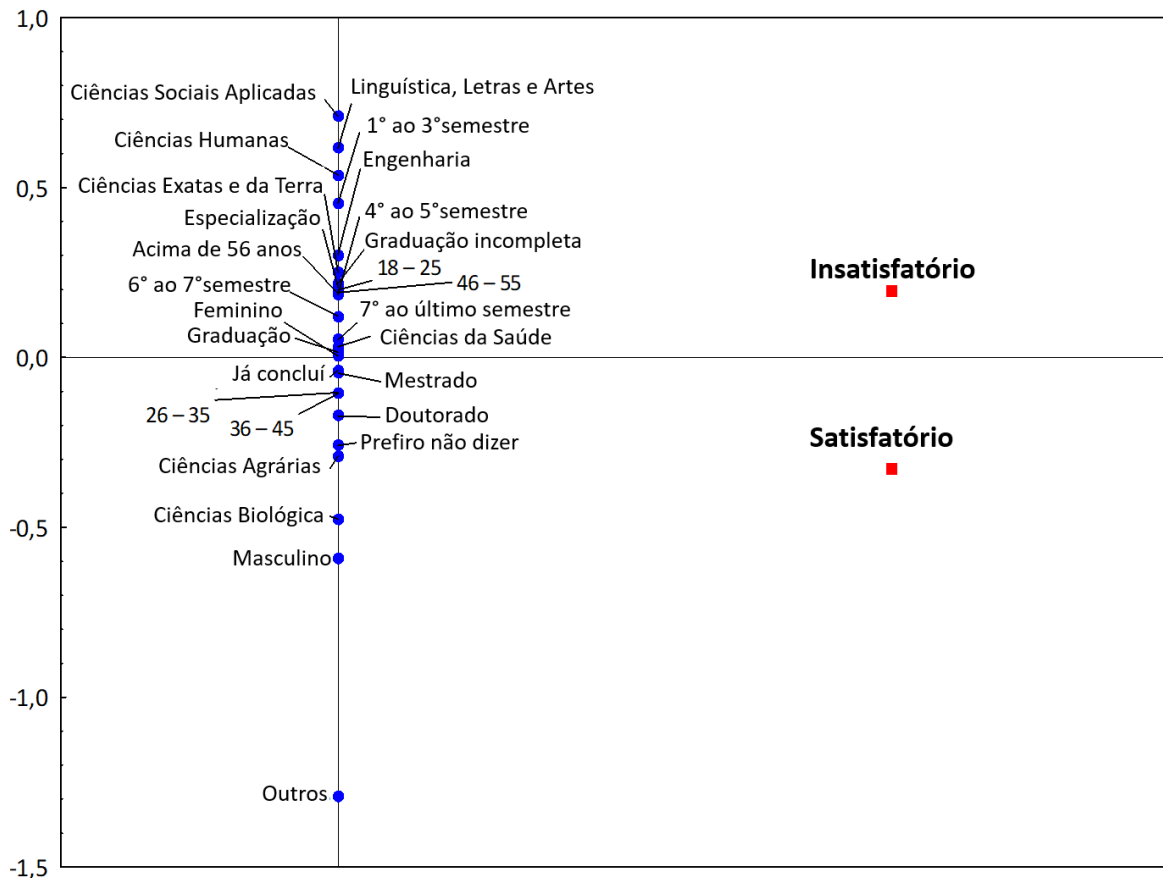
Fonte: Dados da pesquisa.

A análise de correspondência resultou em um mapa multidimensional com os perfis das características dos participantes e a pontuação das questões de conhecimento. Foram identificados dois clusters, dispostos em diferentes quadrantes do gráfico e cujo total representa um modelo que explica 90% da variabilidade dos dados (Figura 3.4).

Os perfis mais próximos do quadrante “satisfatório” tinham formação acadêmica completa com doutorado e mestrado na área de Ciências Agrárias e faixas etárias entre 26 e 45 anos. Posicionados no lado oposto, os perfis com formação de especialização ou com graduação

incompleta e as faixas etárias de 18 a 25 anos e acima de 46 anos posicionaram-se no quadrante “insatisfatório”.

Figura 3.4 – Análise de correspondência das pontuações de perguntas de conhecimento (satisfatório/insatisfatório) de estudantes brasileiros e profissionais do ensino superior sobre técnicas baseadas em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar, considerando a demografia dos participantes e suas características.



Fonte: Dados da pesquisa.

3.5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para avaliar o conhecimento de estudantes de graduação e pós-graduação e profissionais com ensino superior de diferentes regiões do Brasil, sobre temas relacionados a patógenos de origem alimentar e aspectos ligados aos métodos moleculares baseados em PCR. Os resultados da pesquisa, de maneira geral, refletiram conhecimento insatisfatório com pontuação inferior a 70%. Quando observamos estes

resultados por tema abordado, os respondentes foram mais assertivos nas questões relacionadas aos patógenos de origem alimentar.

Para minimizar o viés, os convites para participar da presente pesquisa foram distribuídos em diferentes universidades das cinco regiões do Brasil. A divulgação realizada por meios eletrônicos e redes sociais auxiliou na quantidade de pessoas alcançadas.

A pesquisa incluiu respostas de estudantes do ensino superior e indivíduos com graduação e pós-graduação. Um estudo anterior avaliou a compreensão e adesão da população brasileira às medidas de higiene alimentar e proteção individual necessárias para a prevenção e contenção do COVID-19 (Finger *et al.*, 2021), também atingiram todo o território brasileiro com um questionário sobre plataforma Google®Forms via internet, assim como em nosso estudo.

Entre os 1.246 participantes, 70,8% eram mulheres que responderam ao questionário. Segundo o último censo demográfico no Brasil, há mais mulheres (58,1%) do que homens com ensino superior (IBGE, 2010). Outras pesquisas em ambiente educacional também corroboraram com o presente estudo, visto que a participação feminina foi maior que a masculina (Low *et al.*, 2016; Marklinder *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2022; Mucinhato *et al.*, 2022). No entanto, em nosso estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros ($p > 0,05$ teste do qui-quadrado) na associação do conhecimento por meio.

Na nossa pesquisa, constatamos que 94,3% dos participantes afirmaram compreender o significado de intoxicação alimentar; no entanto, apenas 61,5% responderam corretamente à afirmação. Embora a maioria dos entrevistados tenha frequentado aulas de microbiologia (64,2%), é possível que os patógenos de origem alimentar não tenham sido o foco principal dessas aulas. Estudos internacionais foram conduzidos para avaliar o nível de conhecimento sobre intoxicação alimentar entre estudantes e profissionais que lidam com alimentos. É importante destacar que, no presente estudo, 75,4% dos participantes que tiveram formação em microbiologia acertaram entre 80% e 100% das cinco questões relacionadas a microrganismos patogênicos. A maioria desses entrevistados mencionou possuir formação superior em áreas relacionadas à alimentação, como Tecnologia em alimentos (266), Engenharia dos Alimentos (86), Nutrição (55) e Ciência dos alimentos (31), além de áreas da saúde.

Uma pesquisa foi conduzida com o objetivo de avaliar o conhecimento, atitude e prática preventiva em relação à intoxicação alimentar entre estudantes de pós-graduação em uma universidade pública em Selangor, Malásia. Os resultados indicaram que 67% dos 212

entrevistados tinham conhecimento sobre o que é um surto de intoxicação alimentar, enquanto uma minoria (33,0%) afirmou nunca ter ouvido falar sobre o assunto (Mshelia; Osman; Misni, 2022). Outro estudo realizado na Suécia, envolvendo 606 estudantes universitários, revelou que 35,6% dos entrevistados relataram ter realizado um curso de higiene/segurança dos alimentos e microbiologia durante o ensino médio ou pós-secundário. Foi observada uma correlação significativa entre essa experiência educacional e respostas mais corretas em relação ao conhecimento sobre segurança dos alimentos (Marklinder *et al.*, 2020). De acordo com um estudo realizado sobre a conscientização em relação a doenças transmitidas por alimentos entre estudantes na Arábia Saudita, foi constatado que 85,5% dos 429 entrevistados foram capazes de identificar as causas da intoxicação alimentar. No entanto, metade dos participantes não estava ciente da diferença entre intoxicação alimentar e infecção alimentar (Al-Mohaithef *et al.*, 2020). Outro estudo internacional realizado em Penang, Malásia, revelou que as mulheres possuíam um maior conhecimento dos sintomas de intoxicação alimentar em comparação com os homens (Mahmood *et al.*, 2018). O conhecimento sobre intoxicação alimentar foi considerado um dos aspectos mais negligenciados entre os manipuladores de alimentos na China continental, com uma pontuação média de 7,95 (em uma escala de 0 a 26) em segurança e manuseio de alimentos (Gong *et al.*, 2016). Para prevenir intoxicações alimentares, é fundamental promover o conhecimento e a conscientização sobre intoxicação alimentar entre estudantes e profissionais do ensino superior.

A segurança dos alimentos é ensinada durante as aulas de Biologia no ensino médio. A maioria dos estudantes e profissionais de nível superior foi capaz de identificar patógenos de origem alimentar, como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, que estão entre as principais causas de surtos e doenças transmitidas por alimentos no Brasil (Brasil, 2022c). A distinção entre microrganismos benéficos e patogênicos é fundamental para garantir a segurança dos alimentos, tanto na indústria alimentícia quanto no dia a dia.

Uma pesquisa sobre o conhecimento em segurança dos alimentos foi realizada com 608 manipuladores domésticos de alimentos em Accra, capital de Gana, e revelou que a maioria dos entrevistados estava familiarizada com *Salmonella* spp. (69,7%), mas não com *Escherichia coli* (36,2%) (Akonor, 2013). Outro estudo realizado com manipuladores de alimentos em escolas de Camaçari, Brasil, relatou que 56,6% dos 166 participantes não tinham conhecimento de que o *Staphylococcus aureus* é um microrganismo patogênico responsável por causar intoxicação alimentar (Soares *et al.*, 2012).

Myintzaw *et al.* (2020) constataram que o público em geral residente na Irlanda tinha pouco conhecimento sobre patógenos relacionados a aves. No projeto "*Adote uma Bactéria*", com a participação de 68 alunos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram identificados equívocos completos ou parciais em relação ao conhecimento prévio que os alunos tinham sobre a bactéria adotada. Alguns alunos escreveram que "*a bactéria Streptococcus aureus é um patógeno cutâneo oportunista, produtor de antibióticos e gram-positivo*". Os autores justificam que essas respostas foram baseadas em experiências pessoais, uma vez que os participantes nunca haviam frequentado aulas de microbiologia antes de iniciar o curso na universidade (Piantola *et al.*, 2018).

A disciplina de Biologia Molecular é ministrada durante as aulas de Biologia no ensino médio e possui grande importância no currículo de cursos superiores no Brasil. Essa especialidade é oferecida nos cursos de graduação em Ciências da Saúde, Biológicas e Agrárias. Nas instituições de ensino superior no Brasil, essa disciplina pode ser obrigatória ou opcional nos currículos de graduação e pós-graduação. Ao analisar os dados, verificou-se que a maioria dos entrevistados (71,4%) não estudou Biologia Molecular durante a graduação. É relevante destacar que 381 participantes estavam cursando ou eram formados em profissões como Direito, Geografia, Letras, Matemática, Física e Economia, que geralmente não incluem o estudo específico de Biologia Molecular. Ao considerar apenas as respostas excluindo essas profissões, constatou-se que apenas 34,4% dos participantes cursaram a disciplina de Biologia Molecular durante a graduação, enquanto 65,5% responderam que não tiveram essa experiência.

Considerando que a PCR é um tópico importante nas aulas de Biologia Molecular e a maioria dos respondentes não teve a oportunidade de assistir a essas aulas durante a graduação, apenas 41,7% indicaram ter compreensão sobre a PCR, enquanto 10,3% nunca tinham ouvido falar sobre esse método. Portanto, 882 estudantes e profissionais demonstraram ter um nível de entendimento "pouco" ou "nenhum" em relação aos métodos de PCR. Dos participantes que estudaram Biologia Molecular, 63,7% acertaram entre 70% e 100% das afirmações relacionadas aos métodos baseados em PCR. No entanto, daqueles que não tiveram essa experiência educacional, 83,9% apresentaram um conhecimento insuficiente, com uma porcentagem igual ou inferior a 60%.

Outras pesquisas foram realizadas com estudantes do ensino médio, graduação e pós-graduação para avaliar sua compreensão dos temas de Biotecnologia e Biologia Molecular (Shi

et al., 2010; Couch *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Uhl *et al.*, 2021). No entanto, não foram encontrados estudos que relatassem o conhecimento de alunos de graduação e pós-graduação sobre os métodos moleculares baseados na amplificação de DNA.

Os resultados obtidos permitiram compreender que a maioria dos respondentes teve conhecimento sobre a análise de PCR durante seus cursos de graduação, pós-graduação e através dos testes de COVID-19. Isso sugere que, além do ambiente acadêmico, os métodos de PCR se tornaram mais difundidos na sociedade durante a pandemia de COVID-19, declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março de 2020 (OMS, 2022). É amplamente reconhecido que os testes de PCR, qPCR e ddPCR são ferramentas de diagnóstico rápidas e confiáveis para conter a disseminação da infecção por SARS-CoV-2 (Avetyan *et al.*, 2021; Ishige *et al.*, 2020; Lacombe *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2021).

A PCR tem sido amplamente utilizada para detectar microrganismos em alimentos (Ceuppens *et al.*, 2014; Kim; Kim, 2021). A maioria dos entrevistados (55,29%) respondeu corretamente indicando que a amplificação do DNA por PCR pode detectar patógenos em alimentos. Por outro lado, apenas 26,7% dos participantes marcaram corretamente a opção "falso" para a afirmação de que a análise microbiológica por meio de semeadura em meio de cultura é a forma mais rápida e menos trabalhosa de detectar bactérias patogênicas em alimentos. Embora os métodos clássicos baseados em cultura sejam essenciais para a microbiologia de alimentos, detectando patógenos, deterioração ou microrganismos benéficos, eles podem ser demorados e exigem trabalho, levando dias para obter um resultado final, dependendo do microrganismo alvo e do protocolo de análise (Kim; Kim, 2021). Os métodos baseados em PCR foram aplicados com sucesso e aprimorados ao longo do tempo para detectar rapidamente patógenos, deterioração ou microrganismos benéficos em alimentos (Ceuppens *et al.*, 2014; Elmerdahl, 2000; Kim; Kim, 2021; Scariot *et al.*, 2018; Verruck *et al.*, 2020; Wang; Salazar, 2016).

Este estudo revelou uma associação entre o nível de formação acadêmica e o conhecimento sobre a técnica de detecção de patógenos de origem alimentar baseada em PCR. Participantes com doutorado e idade entre 26 e 45 anos demonstraram ter mais conhecimento sobre o tema em comparação com os demais participantes. A análise de correspondência também confirmou as características dos participantes que apresentaram maior associação, com variáveis em diferentes quadrantes e pontos próximos no gráfico.

Descobertas relacionadas à escolaridade foram relatadas em estudos anteriores. Por exemplo, Southard *et al.* (2016) não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre alunos de nível introdutório e de nível superior ao descrever mecanismos moleculares. Chen *et al.* (2016) avaliaram diferenças no conhecimento sobre temas relacionados à biotecnologia entre alunos que cursavam biologia avançada e aqueles que estudaram há 18 anos. O conhecimento dos alunos atuais aumentou significativamente ($p < 0,001$), e a maioria deles aprendeu algumas definições e exemplos de biotecnologia. Não foram observadas diferenças significativas entre os alunos atuais e os que estudaram há 18 anos em relação às opiniões sobre biotecnologia médica. Couch, Wood e Knight (2015) relataram que alunos de nível introdutório tinham um entendimento incompleto de muitos conceitos de biologia molecular, como também observado em nosso estudo com os entrevistados que ainda não concluíram o curso de graduação.

O objetivo deste estudo foi caracterizar o conhecimento em biologia molecular de universitários e profissionais de nível superior no Brasil. Até onde os autores sabem, nenhuma investigação foi conduzida nesta categoria em relação aos métodos baseados em PCR para a detecção de patógenos transmitidos por alimentos. Embora a maioria dos entrevistados (64,2%) tenha frequentado aulas de microbiologia, apenas 28,57% frequentaram aulas de biologia molecular, o que pode explicar a falta de conhecimento sobre esse tema em sua formação acadêmica e a compreensão de sua importância e aplicações.

Nossa recomendação é que a inclusão obrigatória de aulas de biologia molecular seja implementada no currículo acadêmico dos cursos de graduação no Brasil. Isso ajudará a preencher a lacuna de conhecimento sobre métodos baseados em PCR e patógenos transmitidos por alimentos entre estudantes e profissionais. Além disso, é crucial aumentar a conscientização sobre a importância da biologia molecular e suas aplicações na detecção de patógenos de origem alimentar, visando aprimorar a formação acadêmica e o conhecimento em pesquisa nessa área. A implementação dessa recomendação tem o potencial de fortalecer a base de conhecimento de estudantes e profissionais, capacitando-os para enfrentar os desafios da segurança dos alimentos de forma eficaz.

4 CONCLUSÃO

A maioria dos estudantes com ensino superior e profissionais brasileiros apresentou um nível satisfatório de conhecimento sobre patógenos de origem alimentar. A maioria dos respondentes não tinha conhecimento sobre os métodos baseados em PCR e o nível de formação acadêmica influenciou o conhecimento dos fundamentos analíticos. Nossa pesquisa indicou que a técnica de PCR se tornou bastante conhecida durante o período da pandemia de Covid-19, mas a maioria dos participantes não estudou esse método e sua aplicação para detecção de patógenos de origem alimentar durante a graduação.

Considerando os resultados de nossa pesquisa, sugerimos que os cursos de graduação em Engenharia de Alimentos e em Ciência e Tecnologia de Alimentos incluam aulas obrigatórias de biologia molecular em seus programas acadêmicos.

Capítulo 4

Multiplicação de *Cronobacter sakazakii* em fórmula infantil e mingau à base de amido de milho em diferentes temperaturas de armazenamento

Autores: Lúcia Mara dos Reis Lemos; Bruna Ito Reimão;
Maria Deyonara Lima da Silva; Ana Carolina Maisonnave Arisi.

RESUMO

Cronobacter sakazakii é um importante patógeno de origem alimentar comumente associado a doenças em bebês e crianças da primeira infância. Este estudo teve como objetivo verificar a multiplicação da cepa P4777 *C. sakazakii* em mingau à base de amido de milho e fórmula infantil em pó (FIP) destinados a crianças da primeira infância, em diferentes temperaturas de armazenamento. Inicialmente foi realizada a detecção de *C. sakazakii* por PCR convencional, utilizando iniciadores específicos que amplificam um fragmento do gene *rpoB*. As amostras de FIP e mingau foram inoculadas com *C. sakazakii* e armazenadas a 4, 25 e 37°C por até 48 horas. A presença de *C. sakazakii* foi estimada por contagem em placa em meio de cultivo Luria Bertani ágar (LB) e por detecção de qPCR. Os resultados da contagem em meio LB revelaram uma maior multiplicação mais significativa a 37°C, com acréscimo em relação à quantidade inoculada no tempo zero, alcançando 8,65 log UFC/mL para a FIP e 8,99 log UFC/g para o mingau após 24 horas, e 12,06 log UFC/mL para a FIP e 12,41 log UFC/g para o mingau após 48 horas. A detecção por qPCR utilizando SYBR Green não foi bem-sucedida, uma vez que os controles negativos e as amostras de controle (sem inoculação de *C. sakazakii*) apresentaram resultados elevados de Cq. A PCR convencional realizada nas amostras de FIP e mingau, tanto nas amostras controle quanto nas inoculadas, revelou positividade apenas para as amostras inoculadas. Esses achados destacam a necessidade de aderir estritamente às boas práticas de armazenamento e preparo, especialmente em relação à temperatura.

Palavras-chave: Crescimento microbiano; Contagem em placa; Patógeno de origem alimentar; Primeira infância; qPCR.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cronobacter*, conhecido anteriormente por *Enterobacter sakazakii*, foi definido como uma nova espécie em 1980 (Farmer *et al.*, 1980). Este gênero compreende sete espécies distintas, a saber: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. universalis*, *C. dublinensis*, *C. muytjensii* e *C. condimenti* (Iversen *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2012).

Dentre todas as espécies, destaca-se a espécie *Cronobacter sakazakii* como a principal causadora de doenças. Esta bactéria oportunista, pertencente à família Enterobacteriaceae, é amplamente reconhecida como um patógeno de origem alimentar associado a diversas doenças, incluindo bacteremia, meningite e enterocolite necrosante. Segundo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), as infecções acometem mais crianças recém-nascidas, em que são relatados cerca de dois a quatro casos todos os anos nos Estados Unidos da América (CDC, 2022; Iversen *et al.*, 2007).

A presença deste patógeno é relatada em alimentos secos, principalmente aqueles destinados para crianças, como fórmula infantil em pó, leite em pó, chás de ervas e amidos (CDC, 2022). A persistência do microrganismo está diretamente ligada às condições de armazenamento, sendo mais duradoura em fórmulas infantis com baixa atividade de água (Aw), variando de 0,25 a 0,30 (Gurtler; Beuchat, 2007).

Em fevereiro de 2022, ocorreu um alerta mundial, realizado pela *Food and Drug Administration* (FDA), sobre uma investigação de infecções por *Cronobacter*. Neste sentido, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou o recolhimento de fórmulas infantis de cinco marcas comercializados no Brasil (Brasil, 2022c; FDA, 2022). Pesquisas relatam que a fórmula infantil em pó é uma das principais fontes de infecções de *Cronobacter*, tornando alvo de detecção de diversos estudos (Cai *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2016).

O crescimento e a sobrevivência de *Cronobacter* em fórmula infantil em pó (FIP) foram estudados por Osaili *et al.* (2009), os autores confirmaram que as bactérias do gênero *Cronobacter* cresceram mais rapidamente em fórmulas reconstituídas com água ou leite do que as fórmulas preparadas com sucos de uva ou maçã, quando armazenadas em diferentes temperaturas (4, 25 ou 37°C por até 24 horas). Kandhal *et al.* (2010) relataram que as espécies de *Cronobacter* spp. sobreviveram melhor em altas temperaturas (37 e 42°C). Fang *et al.* (2012) reportaram que a espécie *C. sakazakii* cresceu bem em todas as temperaturas de teste (10 a 48°C) em FIP. Os efeitos da temperatura no crescimento e na resistência ao calor revelaram que

as bactérias *Cronobacter* spp., incluindo a *Cronobacter sakazakii*, demonstraram um crescimento significativo principalmente a 35 e 44°C durante 16 horas de incubação. No entanto, observou-se um crescimento limitado a 15°C e nenhum crescimento a 5°C (Ueda, 2017).

Atualmente, a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde recomendam a utilização de água quente com temperaturas entre 70 e 90°C durante a reconstituição do pó (FAO/WHO, 2004). Para evitar que a fórmula infantil preparada se torne inadequada para o consumo quando deixada à temperatura ambiente, é aconselhável que seja consumida dentro de duas horas após o preparo. E em casos de não consumir dentro desse período, a recomendação é o armazenamento em temperatura de refrigeração em até 24 horas (CDC, 2023b). No entanto, se a reconstituição da fórmula ocorrer em temperaturas baixas, isso pode propiciar o crescimento tanto da bactéria *Cronobacter* quanto de outras Enterobacteriaceae que podem estar presentes na fórmula (Osaili *et al.*, 2009).

Devido à sua capacidade de se multiplicar em ambientes hostis e causar doenças letais, a bactéria *C. sakazakii* representa um desafio significativo para a saúde pública e para a indústria de alimentos (Phair *et al.*, 2022). A necessidade de compreender os mecanismos de sobrevivência e multiplicação de diferentes cepas em produtos alimentícios específicos, como fórmulas infantis e mingau à base de amido de milho, é evidente. No cenário brasileiro, diversas cepas de *Cronobacter* foram isoladas e caracterizadas em uma ampla gama de alimentos, incluindo temperos, ervas, farinhas, queijos e misturas de cereais direcionadas ao público infantil (Brandão *et al.*, 2016; Brandão *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2020; Vasconcellos *et al.*, 2018; Warnken *et al.*, 2012). Nesse contexto, aprimorar as práticas de manipulação doméstica e assegurar a integridade dos produtos destinados a grupos mais suscetíveis torna-se imprescindível. Essa abordagem não apenas contribui diretamente para a prevenção de doenças, mas também fomenta um ambiente de processamento mais seguro e propício à saúde. Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa é avaliar a multiplicação da cepa P4777 de *C. sakazakii* em fórmula infantil em pó (FIP) e mingau à base de amido de milho, ambos destinados para crianças na primeira infância, sob diferentes condições de armazenamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARAÇÃO DA CULTURA DE *C. SAKAZAKII*

A cepa de *Cronobacter sakazakii* INCQS P4777 utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pela Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Instituto Osvaldo Cruz (CBRVS, INCQS, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ). Esta cepa foi isolada de farinha de milho e previamente caracterizada (Brandão *et al.*, 2017).

Para o preparo da cultura das células bacterianas, utilizou-se o meio Brain Heart Infusion (BHI) (Biokar diagnostics, França) para hidratação da cepa liofilizada e cultivo a 37°C por 24 horas. A densidade óptica (DO) da cultura foi medida a 600 nm utilizando Espectrofotômetro (Hitachi U2910, Tóquio, Japão) durante o período de duas, quatro, seis e oito horas. As culturas de estoque foram preparadas e conservadas a -80°C em meio BHI contendo 20% de glicerol.

2.2 PREPARO DA FÓRMULA INFANTIL E MINGAU À BASE DE AMIDO DE MILHO

A fórmula infantil em pó destinada a crianças na primeira infância (1 a 3 anos) e o cereal à base de milho, indicado para bebês a partir de seis meses, foram adquiridos em estabelecimentos comerciais locais em Florianópolis, Brasil. Inicialmente, esses produtos foram submetidos a testes microbiológicos para avaliar a presença de contaminação intrínseca. Utilizou-se a análise de contagem de placas aeróbias em meio Luria Bertani (LB) com ágar (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) para essa avaliação inicial.

As preparações de fórmula infantil e de mingau foram feitas seguindo as recomendações dos fabricantes, realizadas três repetições para cada tempo e temperatura em dias diferentes. Em condições assépticas, foram pesados em um recipiente previamente esterilizado, tendo como base a proporção de 5g da FIP em 30 mL de água. Utilizou-se água potável para reconstituição da fórmula infantil em pó com aquecimento a 70°C. Na preparação do mingau, o cereal foi diluído na fórmula infantil antecipadamente preparada.

Posteriormente, alíquotas de 5 g foram transferidas para tubos de centrifugação com capacidade de 50 mL (Olen, Brasil). Antes da inoculação dos alimentos, a cultura de *C. sakazakii* foi submetida a diluição decimal em solução salina (9%) (Synth, Diadema, SP, Brasil), resultando em uma concentração de 10^3 UFC/mL conforme Osaili *et al.* (2009). As

amostras de fórmula infantil em pó e de mingau enriquecidos foram então homogeneizadas por 2 minutos antes de serem armazenadas a 4°C, 25°C e 37°C por 24 horas e 48 horas. É relevante mencionar que as temperaturas mais elevadas de 25°C e 37°C, embora possam não refletir completamente as condições reais de utilização das amostras, foram selecionadas com base em considerações específicas. Essa escolha foi fundamentada na simulação de cenários que abrangem tanto o armazenamento em ambientes comuns quanto em condições mais desafiadoras, representando uma abordagem abrangente para avaliar a resposta das amostras em diferentes contextos.

2.3 ENUMERAÇÃO DE *C. SAKAZAKII* EM MEIO DE CULTIVO POR CONTAGEM EM PLACA

A enumeração de *C. sakazakii* em BHI, em fórmula infantil e em mingau foi determinada pela contagem em placas. Após diluição seriada da amostra, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em superfície em duplicata em placas de Petri contendo meio LB ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Os dados foram expressos como o número de log₁₀ UFC/ mL (FIP) ou UFC log₁₀ UFC/g (mingau).

2.4 EXTRAÇÃO DE DNA DA CULTURA BACTERIANA

Após 24 horas de crescimento em caldo BHI a 37°C, uma alíquota de 1,5 mL de uma cultura da cepa P4777 de *C. sakazakii* foi centrifugada a 14.000×g por 10 min a 4°C para precipitar as células. A extração de DNA foi realizada utilizando o kit GenElute™ Bacterial Genomic (Sigma - Aldrich, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi estimada a partir de medições em 260 e 280 nm em espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000 (Wilmington, DE, EUA).

2.5 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS

O DNA das amostras de fórmula infantil em pó e de mingau foi extraído usando o kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Hilden, Holanda) seguindo as instruções do fabricante. Para a extração de DNA das amostras de fórmula infantil em pó, foi realizada uma etapa inicial conforme a metodologia proposta por Xie e Liu (2021) com algumas modificações. Alíquotas

de 1 mL foram centrifugadas a 6000×g durante 20 minutos, e o resíduo de gordura na camada superior após a centrifugação foi descartado junto com o sobrenadante (segunda camada), deixando o precipitado para extração de DNA. O DNA das amostras de mingau foi extraído a partir de 100 µL. A concentração e a pureza das soluções de DNA foram medidas espectrofotômetro NanoDrop 2000 Thermo Scientific NanoDrop 2000 (Wilmington, DE, EUA). As amostras de DNA extraídas foram armazenadas a -20 °C até o uso.

2.6 PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE *C. SAKAZAKII*

A detecção de *C. sakazakii* por PCR convencional foi realizada usando os iniciadores específicos para espécie (ACG CCA AGC CTA TCT CCG CG e ACG GTT GGC GTC ATC GTG) que amplificam um fragmento de 514 pb do gene *rpoB* e foram desenhados por Stoop *et al.* (2009).

As condições da PCR seguiram Stoop *et al.* (2009) com modificações. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA extraído, 0,2 µmol/L de cada primer CsakfF/CsakfR, PCR Master Mix 1x (Ludwig Biotec, Brasil) com as seguintes condições de temperatura: etapa inicial de 94 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 65°C por 30 s e 72°C por 1 min com etapa final de extensão a 72°C por 7 min. Posteriormente à PCR, 10 µL de reação dos produtos de PCR com 2 µL de tampão carga (6 X DNA loading Dye Buffer, Ludwig Biotec, Brasil) foram separados por eletroforese em 400mA e 80V por 50 min em gel de agarose 1,5%, utilizando tampão 1X TBE e corado com brometo de etídio. A visualização foi realizada em transiluminador UV e as imagens fotografadas com câmera digital.

2.7 qPCR PARA *C. SAKAZAKII*

A detecção de *Cronobacter sakazakii* por qPCR foi realizada no sistema ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), usando o par de iniciadores Crono F/R (CronoF: GGGATATTGTCCCCTGAAACAG, CronoR: CGAGAATAAGCCGCGCATT), que amplificam um fragmento de 78 pb de uma região específica do gene *dnaG*. Estes iniciadores foram desenhados por Seo & Brackett (2005) e são amplamente empregados para detecção de *Cronobacter sakazakii* em alimentos Chen, Lampel e Hammack (2012).

As reações de amplificação foram realizadas em triplicata ou duplicata em 25 µL de volume final contendo concentração final SYBR Green/Rox 1X Master Mix (Quatro G Biotecnologia, Brasil), 400 nmol/L de cada iniciador Crono e 2 µL de DNA molde de acordo com Xie e Liu (2021). Em todas as placas foram incluídos como DNA molde, os dois controles negativos (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) e controle sem DNA (água).

Os ciclos de amplificação por qPCR foram realizados com as seguintes condições de temperatura: 2 minutos a 50°C, seguidos por 10 minutos a 95°C, e então 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, rampa linear de incremento de temperatura de 60°C a 95°C para curva de dissociação e obtenção de T_m (*melting temperature*). As placas de qPCR foram analisadas utilizando as configurações automáticas do software correspondente.

2.8 CONSTRUÇÃO DE CURVAS PADRÃO PARA qPCR

Curvas padrão foram preparadas com diluições seriadas de DNA genômico isolado de cultura pura de P4777 *Cronobacter sakazakii* para obter a relação *Cycle quantification* (C_q) versus log número de cópias de DNA. O DNA genômico foi diluído em série 10 vezes em água ultrapura até o número final de cópias variando de 10⁷ a 10⁰ cópias do genoma por reação, sendo 10⁷ cópias equivalente a 48,5 ng. O número de cópias de DNA bacteriano foi calculado com base no tamanho do genoma (4,438 Mbp) da cepa de referência no NCBI (ASM351612v3). O número de cópias de *C. sakazakii* nas amostras foi estimado usando valores de C_q e a equação da reta da curva padrão obtida, C_q versus log do número de cópias de DNA.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

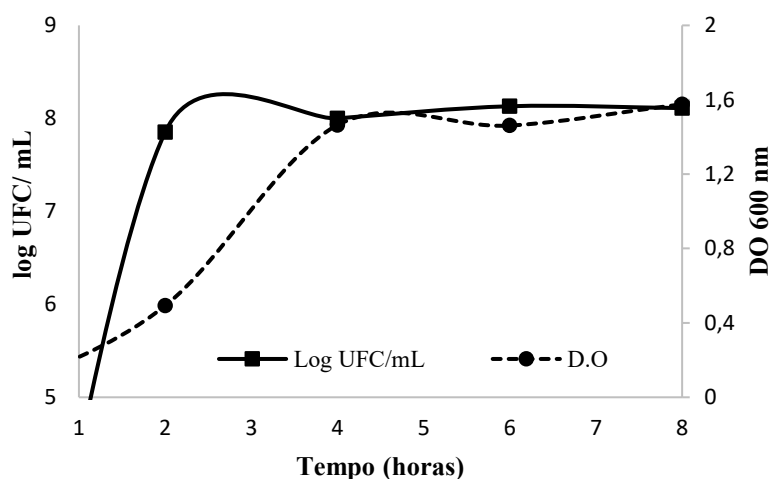
A elaboração da FIP e do mingau nas mesmas condições foram repetidas três vezes. Os dados da contagem em placas (log₁₀ UFC/g e mL) foram analisados para determinar diferenças significativas (P < 0,05) através do teste de Tukey utilizando o Software *Statistica 7* (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

3 RESULTADOS

3.1 CRESCIMENTO DA CULTURA DE *C. SAKAZAKII*

Inicialmente, o crescimento da bactéria *C. sakazakii* em meio BHI a 37 °C foi avaliado em diferentes intervalos de tempo, abrangendo um período de oito horas (Figura 4.1), pela comparação da densidade ótica com a contagem após semeadura em meio LB ágar. Em duas horas, a densidade ótica (DO) foi de 0,49, e a contagem em placa 7,85 log UFC/mL, sugerindo uma rápida multiplicação da bactéria. Após quatro horas, a DO atingiu 1,46, e a contagem em placa foi de 8,0 log UFC/mL. Ao final de oito horas, a DO foi de 1,58, e a contagem foi de 8,11 log UFC/mL.

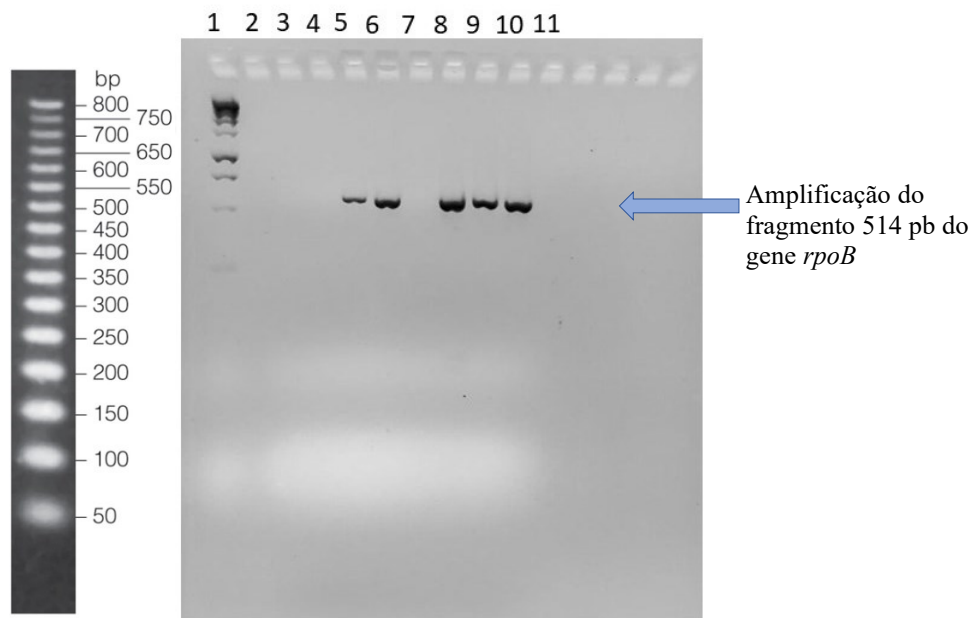
Figura 4.1 – Perfil de crescimento da cepa P4777 *Cronobacter sakazakii* em meio BHI a 37°C por oito horas.



3.2 PCR CONVENCIONAL DA CULTURA BACTERIANA

Para verificar a identidade das colônias crescidas em meio LB foi realizada PCR convencional usando iniciadores *Csakf*. A amplificação do fragmento de 514 pb do gene *rpoB* foi observada para o DNA genômico extraído da cepa P4777 *C. sakazakii* (controle positivo) e para o DNA extraído de colônias isoladas em meio LB ágar, após o crescimento da cepa P4777 em caldo BHI em diferentes temperaturas e semeadura em meio LB ágar (Figura 4.2).

Figura 4.2 – PCR convencional da cepa original P4777 e de colônias de *C. sakazakii* com amplificação do fragmento de 514 pb do gene *rpoB*. Gel de agarose 1,5%. Canaletas: 1. Ladder 1 kb; 2. vazio; 3. Água; 4. Controle negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922; 5-6. P4777 *C. sakazakii*; 7. vazio; 8-10. Colônias isoladas em LB ágar de *C. sakazakii*;



3.3 CRESCIMENTO DE *C. SAKAZAKII* EM FÓRMULA INFANTIL E MINGAU

3.3.1 Contagem em placas em meio LB ágar

As amostras de mingau à base de milho e de fórmula infantil em pó foram submetidas a contagem após semeadura em superfície em meio LB ágar, sem a inoculação de *C. sakazakii*, a fim de verificar o crescimento de microrganismos no meio não específico LB (Tabela 4.1). É importante salientar que o meio de cultura utilizado não é seletivo para esta espécie. Constatou-se que, no tempo zero, nenhuma amostra apresentou contagem de unidades formadoras de colônias. Após um período de armazenamento de 24 horas, observou-se uma contagem variando de 5,95 a 7,70 log UFC/mL para fórmula infantil e 6,20 a 7,38 log UFC/g para o mingau. Esse crescimento pode indicar que as condições podem ser propícias para o desenvolvimento e detecção de diversos microrganismos em meio LB.

Tabela 4.1 – Contagem em meio LB ágar das amostras controle (não inoculadas com *C. sakazakii*) de fórmula infantil e mingau à base de milho armazenadas por 48 h em temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C.

Temperatura	Tempo de armazenamento (h)	Fórmula infantil (log ₁₀ UFC/mL)*	Mingau (log ₁₀ UFC/g)*
	0	<10	<10
Controle 4°C	24	1,98 ± 0,59	2,53 ± 0,14
	48	<10	<10
	0	<10	<10
Controle 25°C	24	5,95 ± 0,12	6,20 ± 0,20
	48	7,70 ± 0,69	7,38 ± 0,27
	0	<10	<10
Controle 37°C	24	6,64 ± 0,05	6,70 ± 0,17
	48	6,60 ± 0,21	6,01 ± 0,02

*Os valores representam médias de três repetições ± DP

No armazenamento a 4°C, nas amostras de fórmula infantil em pó (FIP) inoculadas com *C. sakazakii*, a contagem em placas em meio LB foi de 2,95 log UFC/mL no tempo zero, diminuindo para 2,89 log UFC/mL após 24 horas e para 2,69 log UFC/mL após 48 horas (Tabela 4.2). Essa variação no último tempo de armazenamento representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$). Para as amostras de mingau, quando mantidas a 4°C após 24 horas, a contagem diminuiu para 2,80 log UFC/g, e após 48 horas, foi de 2,75 log UFC/g. Estas oscilações no crescimento microbiano ao longo do tempo sugerem uma dinâmica complexa das populações microbianas capazes de crescer em meio LB nos alimentos estudados.

Tabela 4.2 – Contagem em meio LB ágar de amostras de fórmula infantil e mingau à base de milho inoculadas com *C. sakazakii* cepa P4777 e armazenadas por 48 h em temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C.

Temperaturas	Tempos de armazenamento (h)	Fórmula infantil (log ₁₀ UFC/mL)*	Mingau (log ₁₀ UFC/g)*
4°C	0	2,95 ± 0,07 a† B‡	3,18 ± 0,22 a A
	24	2,84 ± 0,19 ab A	2,80 ± 0,09 b A
	48	2,69 ± 0,08 b A	2,75 ± 0,10 b A
25°C	0	2,94 ± 0,27 c A	3,35 ± 0,66 a A
	24	9,09 ± 0,13 a A	8,98 ± 0,21ab A
	48	8,62 ± 0,12 b A	8,94 ± 0,31 a B
37°C	0	3,42 ± 0,27 c A	3,13 ± 0,19 c A
	24	12,07 ± 0,60 b A	12,12 ± 0,58 b A
	48	15,48 ± 0,28 a A	15,54 ± 0,25 a A

*Os valores representam médias de três repetições ± DP

†As médias dentro do mesmo tipo de alimento, temperatura de armazenamento e coluna com diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes (P < 0,05).

‡As médias dentro da mesma linha entre os dois alimentos com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes (P < 0,05).

Houve diferença estatística (P < 0,05) entre as amostras inoculadas com *C. sakazakii* somente na temperatura de 25°C durante o armazenamento por 48 horas (Tabela 4.2). A 25°C, observou-se que o crescimento aumentou 6,15 log UFC/mL após 24 horas de armazenamento da fórmula infantil em pó. No entanto, após 48 horas, houve uma ligeira redução, embora permanecesse em um nível elevado. Já no mingau a 25°C, a contagem em meio LB foi semelhante, com aumento de 5,63 log UFC/g após 24 horas e 5,59 log UFC/g após 48 horas em relação ao tempo zero. É importante notar que para amostras de mingau, a contagem foi mais estável ao longo do período de 48 horas em comparação com a FIP, onde houve uma ligeira redução após 48 horas.

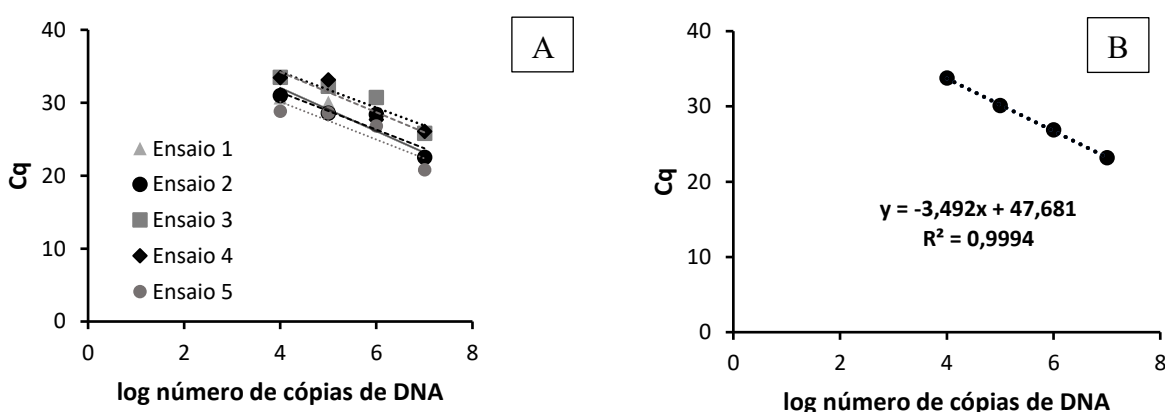
A 37°C, observou-se um significativo aumento na contagem em meio LB nas amostras inoculadas com *C. sakazakii* de ambos os alimentos (Tabela 4.2). Após 24 horas de armazenamento, o crescimento aumentou 8,65 log UFC/mL para a FIP e 8,99 log UFC/g para

o mingau, indicando um rápido crescimento bacteriano nessas condições. Esse crescimento foi ainda mais pronunciado após 48 horas, com aumento de 3,41 log UFC/mL para a FIP e 3,42 log UFC/g para o mingau em relação a tempo anterior de armazenamento (24 horas). Esses números destacam a capacidade da *C. sakazakii* de se proliferar vigorosamente em ambas as matrizes alimentares quando exposto a temperaturas mais elevadas. Como o meio LB não é um meio seletivo diferencial para *C. sakazakii*, a contagem em meio LB pode incluir outras bactérias capazes de crescer em LB.

3.3.2 Ensaio de qPCR

Para realizar a contagem seletiva de *C. sakazakii*, utilizamos qPCR com iniciadores específicos para *C. sakazakii* (Chen *et al*, 2012). Foram conduzidas cinco corridas de qPCR a partir da diluição seriada de DNA puro para obter curva padrão de qPCR (Figura 4.3 A). Foram utilizados diferentes extratos de DNA obtidos a partir da cepa pura e de colônias isoladas em meio LB da bactéria após crescimento da cepa pura. A partir da cepa pura, a curva padrão apresentou coeficiente de correlação linear adequado (R^2) de 0,9994 e eficiência de 93,36% (Figura 4.3 B). O limite de detecção foi de 10^4 cópias do genoma.

Figura 4.3 – Curvas padrão do ensaio qPCR para *Cronobacter sakazakii* utilizando iniciadores Crono F/R (Cq versus log cópias de DNA genômico).



Curva padrão de cinco ensaios realizados em quatro placas de qPCR em dias diferentes usando diferentes extratos de DNA da cepa P4777 *Cronobacter sakazakii* (A). Curva padrão a partir da cepa P4777 *Cronobacter sakazakii* utilizada no ensaio das amostras de FIP e mingau (B).

Como controles negativos da qPCR, utilizamos DNA bacteriano extraído de duas espécies, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. No caso de DNA de *Pseudomonas aeruginosa*, observamos valores médios de Cq variando de 27,66 a 29,11 e um amplicon com Tm variando de 79,7 a 87,5. Quanto ao DNA de *E. coli*, os valores médios de Cq variaram de 27,46 a 28,36, com um Tm de 79,5 a 79,6. Estes valores não são adequados para os controles negativos, uma vez que Cq tardio e não específico deve ser superior a 35 e os valores de Tm diferentes em relação ao valor de Tm para o gene específico (Ilha *et al.*, 2016).

Em contraste, para o DNA extraído da cepa de *C. sakazakii*, em seu primeiro ponto da curva padrão, os valores médios de Cq obtidos variaram de 20,89 a 23,19 e Tm com valores de 81,76 a 82,21. Esses resultados foram satisfatórios para a detecção de 10^7 cópias de DNA de *C. sakazakii*.

Os valores de Cq obtidos na qPCR para o DNA extraído das amostras controle FIP e mingau (sem inoculação de *C. sakazakii*) foi de 26,34 a 32,65 e 25,91 a 29,60 respectivamente. Valores de Tm variando de 78,34 a 80,47 para o FIP e 79,31 a 82,40 para o mingau. Os valores de Cq obtidos na qPCR de *C. sakazakii* P4777 para DNA extraído de amostras FIP variaram de 26,02 a 28,78 e Tm de 79,70 a 82,01. Para as amostras de mingau, os valores de Cq foram de 24,06 a 29,35 e Tm de 79,31 a 81,82.

O ensaio de PCR quantitativo utilizando SYBR Green não obteve sucesso, uma vez que os controles negativos e as amostras controle apresentaram resultados elevados de Cq. Este fenômeno não indica necessariamente a presença de *Cronobacter*, mas sugere uma limitação na especificidade do ensaio, especialmente quando não se utiliza a sonda de hidrólise em conjunto com os iniciadores (Chen *et al.*, 2012).

Diante dessa limitação, realizamos PCR convencional utilizando iniciadores *Csakf* com DNA extraído das amostras de FIP e de mingau controles e inoculadas. Os resultados foram positivos para a presença de *Cronobacter* apenas nas amostras inoculadas (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Resultados da PCR convencional usando iniciadores *Csakf*, que amplificam o fragmento de 514 pb do gene *rpoB*, das amostras controle (não inoculadas) de fórmula infantil e mingau à base de milho e das amostras de fórmula infantil e mingau à base de milho inoculadas com *C. sakazakii* cepa P4777 e armazenadas por 48 h em temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C.

Temperatura	Tempo de armazenamento (h)	Fórmula infantil (controle)	Mingau (controle)	Fórmula infantil (inoculadas)	Mingau (inoculadas)
4°C	0	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	48	-	-	-	-
25°C	0	-	-	-	-
	24	-	-	+	-
	48	-	-	+	+
37°C	0	-	-	-	-
	24	-	-	+	+
	48	-	-	+	+

(+) Espécie de *C. sakazakii* detectada; (-) Espécie de *C. sakazakii* não detectada.

Vale destacar que o limite de detecção das amostras positivas foi estabelecido em 10^5 cópias de DNA (Tabela 4.4). Essa abordagem complementar permitiu esclarecer a necessidade de sonda no ensaio de qPCR, proporcionando uma avaliação mais específica da presença de *C. sakazakii* nas amostras analisadas.

Tabela 4.4 – Resultado de detecção por PCR convencional usando iniciadores *Csakf*, que amplificam o fragmento de 514 pb do gene *rpoB*, das amostras da curva padrão de diluição seriada de DNA de *C. sakazakii*.

Número de cópias de DNA	1º dia	2º dia
10 ⁰	-	-
10 ¹	-	-
10 ²	-	-
10 ³	-	-
10 ⁴	-	-
10 ⁵	-	+
10 ⁶	+	+
10 ⁷	+	+

(+) Positivo para detecção de *C. sakazakii*; (-) Negativo para detecção de *C. sakazakii*.

4 DISCUSSÃO

As fórmulas infantis em pó são reconhecidas como potenciais fontes de diversas espécies de *Cronobacter* (Kandhal *et al.*, 2010; Osaili *et al.*, 2009; Song; Shukla; Kim, 2018; Warnken *et al.*, 2012). Devido à sua composição e ao processo de fabricação, essas fórmulas podem fornecer um ambiente propício para o crescimento e a sobrevivência dessas bactérias. A contaminação pode ocorrer tanto de forma intrínseca, relacionada aos ingredientes e processos de fabricação, quanto de forma extrínseca, envolvendo a manipulação inadequada durante o preparo e o armazenamento das fórmulas (Chauhan *et al.*, 2020). Além das fórmulas infantis, os cereais infantis, como produtos à base de amido, também foram identificados como fontes potenciais para a contaminação por *Cronobacter*. A natureza desses cereais oferece um substrato favorável para o crescimento de *Cronobacter* (Carvalho *et al.*, 2020).

Neste estudo, conduzimos uma avaliação da multiplicação da bactéria *C. sakazakii* em diferentes condições de temperatura e armazenamento. Utilizamos como substratos de estudo a fórmula infantil em pó e o mingau preparado à base de cereal de milho. A detecção da espécie

C. sakazakii foi inicialmente confirmada por meio de análises de PCR convencional, garantindo a base para nossas investigações subsequentes sobre o comportamento desse patógeno em diferentes cenários de armazenamento e temperatura.

Estudos anteriores foram realizados com crescimento de *Cronobacter* em fórmula infantil. Osali *et al.* (2009) avaliaram o crescimento de *Cronobacter sakazakii* e *Cronobacter muytjensii* em fórmulas reconstituídas e armazenadas a 4, 25 e 37°C por até 24 horas. A 25 e 37°C, *Cronobacter* cresceu mais ($>5 \log_{10}$) em fórmulas reconstituídas com água ou leite do que aquelas preparadas com sucos de uva ou maçã (2–3 \log_{10}). Conforme o nosso estudo, os microrganismos persistiram, mas não ocorreu aumento da contagem nas amostras de fórmula infantil armazenadas a 4°C. Fang *et al.* (2012) pesquisaram crescimento de *C. sakazakii* com injúria térmica em fórmula infantil em pó reconstituída. Amostras de fórmula infantil inoculadas com um coquetel de seis cepas de *C. sakazakii* não submetidas a tratamento térmico (não danificadas) ou com injúria térmica, foram incubadas em diferentes temperaturas para desenvolver modelos de crescimento. Os resultados do estudo indicam que *C. sakazakii* é capaz de crescer efetivamente em uma ampla faixa de temperaturas (10 a 48°C), com exceção de armazenamento a 6°C.

Huertas *et al.*, (2015) conduziram experimentos *C. sakazakii* em PIF reconstituídos em diferentes temperaturas da água (50, 55, 60, 65, 70°C) e confirmaram que a bactéria pode sobreviver por longos períodos na fórmula em pó e é capaz de proliferar após a reconstituição. Esse estudo também revelou que a reconstituição da fórmula infantil utilizando água a temperaturas entre 50 e 65 °C não resultou em uma inativação significativa das células de *C. sakazakii*. Por outro lado, a reconstituição a 70°C conseguiu reduzir a presença dessa bactéria a níveis abaixo do limite de detecção. No entanto, observou-se, mesmo quando submetida a essa temperatura mais elevada, as células sobreviventes de *C. sakazakii* ainda eram capazes de se multiplicar e atingir níveis perigosos quando o produto reconstituído era armazenado por longos períodos à temperatura ambiente. Ueda (2017) avaliaram os efeitos da temperatura no crescimento e na resistência ao calor de *C. sakazakii*, *C. dubliensis*, *C. malonaticus* e *C. turicensis*. Segundo o autor, todas as cepas de *Cronobacter* demonstraram crescimento e multiplicação mais significativos nas faixas de temperatura de 35°C e 44°C, atingindo essas taxas máximas após 16 horas de incubação. Em contrapartida, foi observado um crescimento limitado a 15°C e nenhuma proliferação a 5°C. A 48°C, as bactérias apresentaram crescimento notável durante o período de 6 a 8 horas de incubação, porém, após 16 horas, houve uma

diminuição gradual ou inativação do crescimento bacteriano. Chauhan *et al.* (2020) revelou que *C. sakazakii* demonstrou uma notável tolerância térmica, mesmo após ser submetido a condições de estresse fisiológico. As cepas de *C. sakazakii* foram avaliadas independentemente a 52, 55 e 58°C, após serem expostas a estresses. Os resultados demonstraram que a sobrevivência de todas as cepas diminuiu significativamente ($p < 0,05$) após a dessecação (a 25°C por 4 dias) em comparação com as condições de controle (sem exposição a estresse).

Todos esses estudos mencionados anteriormente oferecem revelações valiosas sobre a resistência e a sobrevivência do patógeno *C. sakazakii* em diferentes condições ambientais e de estresse. Também destacam a notável capacidade dessa bactéria em persistir e resistir a desafios, mesmo após exposição a condições adversas e sublinham a necessidade contínua de vigilância e medidas rigorosas de controle para garantir a segurança de alimentos, especialmente em produtos voltados para bebês e crianças da primeira infância, onde a presença de *C. sakazakii* representa um sério risco à saúde pública.

No que diz respeito ao ensaio de qPCR que conduzimos, é importante destacar alguns fatores relacionados à execução dessa análise. Utilizamos na qPCR o fluoróforo intercalante de DNA em vez de uma sonda específica, seguindo as orientações do *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) que reporta condições de detecção de *C. sakazakii* com uso de sonda de hidrólise (Chen *et al.*, 2012). É importante notar que o fluoróforo intercalante, embora seja uma opção viável, não é específico como uma sonda de hidrólise. Isso pode ser considerado uma desvantagem, pois pode levar a resultados falsos positivos se houver qualquer amplificação de DNA não específica. Já as sondas de hidrólise são altamente específicas e, portanto, reduzem o risco de resultados falsos positivos.

Diferentemente da nossa abordagem, Xie e Liu (2021) desenvolveram um ensaio ddPCR utilizando sonda de hidrólise para a enumeração de *C. Sakazakii* em dois tipos de alimentos infantis. O diferencial desse ensaio reside na sua especificidade, que resultou na geração exclusiva de sinais fluorescentes apenas para a bactéria alvo. Outros estudos reportados na literatura utilizaram qPCR para detecção de *C. Sakazakii*. Zhou *et al.* (2016) desenvolveram qPCR combinado com desoxicolato de sódio (SD) e monoazida de propídio (PMA) para detecção rápida e sensível de *Cronobacter sakazakii* em fórmulas infantis em pó. Qin *et al.* (2020) utilizaram a combinação de SDS e PMA com ensaio qPCR para detecção precisa de *C. sakazakii* no leite. Lv *et al.* (2021) conduziram quantificação de células viáveis, mas não

cultiváveis de *C. sakazakii*, utilizando a combinação de PMAxx com ddPCR. Esse método foi aplicado na detecção desse patógeno em diversas variedades de alimentos infantis.

5 CONCLUSÃO

Foi possível realizar o perfil de crescimento da cepa *C. sakazakii* P4777 e a detecção por PCR convencional com base no gene *rpoB*. Os resultados deste estudo destacam que a temperatura de armazenamento desempenha um papel crítico no crescimento da bactéria *C. sakazakii* em alimentos infantis. Observou-se um crescimento vigoroso de *C. sakazakii* a 37°C, com contagens substancialmente elevadas após 24 e 48 horas. Isso ressalta a importância de seguir rigorosamente as boas práticas durante o preparo, especialmente em relação à temperatura, para proteger a saúde das crianças na primeira infância.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Realizamos um estudo de prospecção científica que forneceu uma base valiosa das tendências nas publicações científicas ao longo das últimas décadas, destacando a crescente importância da aplicação de vPCR na detecção de patógenos em alimentos. Espera-se que este trabalho inspire e oriente futuras pesquisas nesse campo, contribuindo para avanços na segurança de alimentos e na prevenção de DTHA.

Este trabalho representa o primeiro esforço conhecido para avaliar o conhecimento sobre métodos baseados em PCR e patógenos transmitidos por alimentos entre estudantes e profissionais brasileiros de graduação e pós-graduação no Brasil. Até onde sabemos, este estudo pioneiro lança reflexões sobre lacunas importantes no entendimento desses tópicos cruciais e destaca a necessidade de iniciativas de formação acadêmica mais robustas no campo da segurança dos alimentos e nas técnicas baseadas em PCR.

Aplicamos as técnicas PCR convencional e qPCR para investigar o crescimento em alimentos do patógeno *C. sakazakii*, que representa uma séria ameaça à saúde de bebês e crianças da primeira infância. Como sugestão para trabalho futuros, é essencial utilizar sondas de hidrólise para garantir a especificidade do ensaio de qPCR, evitando resultados falsos positivos e garantindo uma detecção precisa de *C. sakazakii*, bem como sua quantificação através dessa técnica.

REFERÊNCIAS

ABD EL-AZIZ, N. K. *et al.* Polymerase Chain Reaction for Enumeration of Some Viable but Nonculturable Foodborne. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 4, p. 226–234, 2018.

AGRIMONTI, C. *et al.* Application of real-time PCR (qPCR) for characterization of microbial populations and type of milk in dairy food products . **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, n. September, p. 1–69, 2017.

AGUSTÍ, G.; FITTIPALDI, M.; CODONY, F. Optimization of a Viability PCR Method for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Food Samples. **Current Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 779–785, 2018.

AKINEDEN, Ö. *et al.* Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. **Food Microbiology**, v. 65, p. 44–50, 2017.

AKONOR, P. AKNOR, M. A. Food Safety Knowledge: The Case of Domestic Food Handlers in Accra. **European Journal of Nutrition & Food Safety**, v. 3, n. 3, p. 99–111, 2013.

AL-MOHAITHEF, M. *et al.* Assessment of foodborne illness awareness and preferred information sources among students in Saudi Arabia: A cross-sectional study. **Food Control**, v. 112, n. December 2019, p. 107085, 2020.

AL-SHABIB, N. A.; HUSAIN, F. M.; KHAN, J. M. Study on food safety concerns, knowledge and practices among university students in Saudi Arabia. **Food Control**, v. 73, p. 202–208, 1 mar. 2017.

ASCHENBRENNER, J.; MARX, A. DNA polymerases and biotechnological applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 48, p. 187–195, 2017.

AVETYAN, D. *et al.* SARS-CoV-2 detection by extraction-free qRT-PCR for massive and rapid COVID-19 diagnosis during a pandemic in Armenia. **Journal of Virological Methods**, v. 295, n. January, p. 114199, 2021.

BARRETTA, C. *et al.* *Listeria monocytogenes* survival in raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet under in vitro simulated gastrointestinal conditions by culture, qPCR and PMA-qPCR detection methods. **Lwt**, v. 107, n. November 2018, p. 132–137, 2019.

BERNARDO, R. *et al.* *Listeria monocytogenes* assessment in a ready-to-eat salad shelf-life study using conventional culture-based methods, genetic profiling, and propidium monoazide quantitative PCR. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 1–14, 2021.

BIOTIUM. **PMA (Propidium Monoazide)**. Disponível em: <<https://biotium.com/product/pma-propidium-monoazide/>>. Acesso em: 22 maio. 2022.

BISHT, A. *et al.* A surveillance of food borne disease outbreaks in India: 2009–2018. **Food Control**, v. 121, n. August 2020, p. 107630, 2021.

BOSCH, A. *et al.* Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, n. May, p. 110–128, 2018.

BRANDÃO, M. *et al.* Identificação de *Cronobacter* spp. em queijos e perfil de suscetibilidade antimicrobiana Identification of *Cronobacter* spp. in cheeses and the antimicrobial susceptibility profile. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, n. 1697, p. 1–6, 2016.

BRANDÃO, M. L. L. *et al.* Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods. **Food Microbiology**, v. 63, p. 129–138, 2017.

BRANDÃO, M. L. L. *et al.* Identificação de *Cronobacter* spp. em queijos e perfil de suscetibilidade antimicrobiana Identification of *Cronobacter* spp. in cheeses and the antimicrobial susceptibility profile. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, n. 1697, p. 1–6, 2016.

BRANDÃO, M. L. L.; UMEDA, N. S.; De FILIPPIS, I. *Cronobacter* spp.: Infections, occurrence and food regulations - A review in Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

BRASIL. **Anvisa alerta sobre recolhimento de fórmulas infantis das marcas Human Milk Fortifier, Similac PM 60/40, Similac, Alimentum e EleCare.** Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-alerta-sobre-recolhimento-de-formulas-infantis-marca-similac-alimentum-e-elecare>>. Acesso em: 17 maio. 2022c.

BRASIL. **Cadastro Nacional de Cursos e Instituições de Ensino Superior.** Disponível em: <<https://emec.mec.gov.br/>>. Acesso em: 20 jan. 2022d.

BRASIL. **Destalhe do Curso - (2693) Bacharelado em engenharia de alimentos.** Disponível em: <<https://emec.mec.gov.br/emec/consulta-cadastro/detalhamento/d96957f455f6405d14c6542552b0f6eb/NTQ=/9f1aa921d96ca1df24a34474cc171f61/NjI=>>>. Acesso em: 20 jan. 2022e.

BRASIL. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA).** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha>>. Acesso em: 14 jul. 2023a.

BRASIL. **Instrução Normativa - IN N° 161, de 1° de julho de 2022.** Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2>. Acesso em: 14 jul. 2023a.

BRASIL. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.** Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/images/Oficio_Circular_2_24fev2021.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar Informe - 2023.** Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023>. 2023b.

BRASIL. **Resolução - RDC N° 724, de 1° de julho de 2022. Dispõe** Disponível em: < https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_724_2022_.pdf/33c61081-4f32-43c2-9105-c318fa6069ce#:~:text=Disp%C3%B5e%20sobre%20os%20padr%C3%B5es%20microbiol%C3%B3gicos%20dos%20alimentos%20e%20sua%20aplica%C3%A7%C3%A3o.&text=DISP%20SI%20PRELIMINARES-,%20dos%20alimentos%20e%20sua%20aplica%C3%A7%C3%A3o.>. Acesso em: 21 set. 2023b.

BRAUGE, T. *et al.* Treatment with disinfectants may induce an increase in viable but non culturable populations of *Listeria monocytogenes* in bio fi lms formed in smoked salmon processing environments. **Journal Of Food Microbiology**, v. 92, n. December 2019, p. 103548, 2020.

CAI, X. Q. *et al.* Rapid Detection and Simultaneous Genotyping of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in Powdered Infant Formula Using Real-time PCR and High Resolution Melting (HRM) Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 4–11, 2013.

CAO, X. *et al.* Detection of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples using improved real-time PCR and real-time LAMP methods. **Food Control**, v. 103, n. April, p. 145–152, 2019.

CARVALHO, G. G. *et al.* Isolation, comparison of identification methods and antibiotic resistance of *Cronobacter* spp. in infant foods. **Food Research International**, v. 137, n. April, p. 109643, 2020.

CATTANI, F. *et al.* Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* group species in milk by propidium monoazide quantitative real-time PCR. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2617–2624, 2016.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (2023). **Foodborne and waterborne outbreaks.** Diponível em: <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/> Acesso em: 10 ago. 2023a.

CDC. **Cronobacter and Powdered Infant Formula Investigation.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/cronobacter/outbreaks/infant-formula.html>>. Acesso em: 18 maio. 2022.

CDC. **Infant Formula Preparation and Storage.** Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/nutrition/infantandtoddlernutrition/formula-feeding/infant-formula-preparation-and-storage.html>>. Acesso em: 25 set. 2023b.

CEUPPENS, S. *et al.* Molecular methods in food safety microbiology: Interpretation and implications of nucleic acid detection. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 551–577, 2014.

CHAPELA, M. J.; Garrido-Maestu, A.; Cabado, A. G. Detection of foodborne pathogens by qPCR: A practical approach for food industry applications. **Cogent Food and Agriculture**, v. 1, n. 1, 2015.

CHAUHAN, R. *et al.* Trending biocontrol strategies against *Cronobacter sakazakii*: A recent updated review. **Food Research International**, v. 137, n. May, p. 109385, 2020.

CHEN, J. Q. *et al.* PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 2, p. 39–59, 2017.

CHEN, S. Y. *et al.* Students' knowledge of, and attitudes towards biotechnology revisited, 1995-2014: Changes in agriculture biotechnology but not in medical biotechnology. **Biochemistry and molecular biology education: a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, n. 5, p. 475–491, 2016.

CHEN Y, LAMPEL K. HAMMACK, T . **BAM Chapter 29: Cronobacter**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-29-cronobacter>>.

CHIN, N. A. *et al.* Recent trends and developments of PCR-based methods for the detection of food-borne *Salmonella* bacteria and Norovirus. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 12, p. 4570–4582, 2022.

CHIU, T. H. *et al.* Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 259–265, 2005.

COCOLIN, L. *et al.* Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 167–178, 2005.

COSTA, P. V. *et al.* Cytotoxicity profile of *Cronobacter* species isolated from food and clinical specimens in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 5, p. 1758–1769, 2020.

COSTA, P. V. *et al.* Diversity of *Cronobacter* genus isolated between 1970 and 2019 on the American continent and genotyped using multi-locus sequence typing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 5, p. 1–10, 2021.

COUCH, B. A.; WOOD, W. B.; KNIGHT, J. K. The molecular biology capstone assessment: A concept assessment for upper-division molecular biology students. **CBE Life Sciences Education**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2015.

CRESPO-SEMPERE, A. *et al.* International Journal of Food Microbiology Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 214–220, 2013.

CSORBA, C. *et al.* Prevalence, characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in a milk powder processing environment: The first reported case in Serbia. **Food Science and Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 554–563, 2022.

DINU, L. D.; BACH, S. Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157: H7 from vegetable samples using quantitative PCR with propidium monoazide and immunological assays. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 268–273, 2013.

DONG, K. *et al.* Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, p. 149–183, 2019a.

DONG, L. *et al.* Quantitative PCR coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 4936–4943, 1 jun. 2018.

DONG, L. *et al.* Short communication: Quantitative PCR coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of culturable *Escherichia coli* in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 6914–6919, 2019b.

DONG, X. *et al.* Rapid PCR powered by microfluidics: A quick review under the background of COVID-19 pandemic. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 143, p. 116377, 2021.

DORN-IN, S.; Gareis, M.; Schwaiger, K. Differentiation of live and dead *Mycobacterium tuberculosis* complex in meat samples using PMA qPCR. **Food Microbiology**, v. 84, n. January, p. 103275, 2019.

DUARTE, A. *et al.* Effect of exposure to stress conditions on propidium monoazide (PMA)-qPCR based *Campylobacter* enumeration in broiler carcass rinses. **Food Microbiology**, v. 48, p. 182–190, 2015.

DUBOVITSKAYA, O. *et al.* Quantitative assessment of *Campylobacter* spp. levels with real-time PCR methods at different stages of the broiler food chain. **Food Microbiology**, v. 110, n. March 2022, p. 104152, 2023.

EFSA. European Food Safety Authority. (2023). **Foodborne outbreaks** - Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/microstrategy/FBO-dashboard>. Acesso: 10 ago, 2023.

ELIZAQUÍVEL, P. *et al.* Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil activity against *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* by propidium monoazide quantitative PCR in vegetables. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 770–776, 2013.

ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 1–13, 2014.

ELIZAQUÍVEL, P.; SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157 : H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 704–708, 2012.

ELMERDAHL OLSEN, J. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. **Food Research International**, v. 33, n. 3–4, p. 257–266, 2000.

ELKHAWAGA, A. A. *et al.* Emergence of *Cronobacter sakazakii* in Cases of Neonatal Sepsis in Upper Egypt: First Report in North Africa. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. March, p. 1–9, 2020.

ESTRADA, C. S. M. L. *et al.* Comparison of DNA extraction methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* detection from meat food by nested PCR. **Food Research International**, v. 40, p. 637–642, 2007.

FAILLE, C. *et al.* International Journal of Food Microbiology Comparison of the performance of the bio fi lm sampling methods (swab , sponge , contact agar) in the recovery of *Listeria monocytogenes* populations considering the seafood environment conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 325, n. October 2019, p. 108626, 2020.

FANG, J. *et al.* Propidium monoazide real-time loop-mediated isothermal amplification for specific visualization of viable *Salmonella* in food. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 79–88, 2018.

FANG, T.; Gurtler, J. B.; Huang, L. Growth Kinetics and Model Comparison of *Cronobacter sakazakii* in Reconstituted Powdered Infant Formula. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 9, p. 1–9, 2012.

FARMER, J. J. *et al.* *Enterobacter sakazakii*: A new species of “Enterobacteriaceae” isolated from clinical specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, n. 3, p. 569–584, 1980.

FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula: Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series No. 15. Rome. 84pp. 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization Of The United Nations/World; Organization. ***Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula**. p. 84, 2008.

FEITOSA, B. F. *et al.* Bioactive Natural Products for Chemical Control of Microorganisms: Scientific Prospecting (2001-2021) and Systematic Review. **Molecules**, v. 27, n. 5917, p. 1–16, 2022.

FERRENTINO, G. *et al.* Application of culture-independent methods for monitoring *Listeria monocytogenes* inactivation on food products. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 188–193, 2015.

FDA. **Investigation of *Cronobacter* Infections: Powdered Infant Formula (February 2022)**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/fda-investigation-cronobacter-infections-powdered-infant-formula-february-2022>>. Acesso em: 18 maio. 2022

FINGER, J. A. F. F. *et al.* Adherence to food hygiene and personal protection recommendations for prevention of COVID-19. **Trends in Food Science and Technology**, v. 112, n. October 2020, p. 847–852, 2021.

FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 2, p. 276–289, 2012.

FODDAI, A. C. G.; GRANT, I. R. Methods for detection of viable foodborne pathogens: current state-of-art and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 10, p. 4281–4288, 2020.

GAO, R. *et al.* The diagnostic tools for viable but nonculturable pathogens in the food industry: Current status and future prospects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 2146–2175, 2021.

GONG, S. *et al.* Knowledge of food safety and handling in households: A survey of food handlers in Mainland China. **Food Control**, v. 64, p. 45–53, 2016.

GÖRÜR, N.; TOPALCENGİZ, Z. Food safety knowledge, hygiene practices, and eating attitudes of academics and university students during the coronavirus (COVID-19) pandemic in Turkey. **Journal of Food Safety**, v. 41, n. 5, p. 1–10, 2021.

GOVINDASWAMY, J. *et al.* Digital Droplet-PCR for Quantification of Viable *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Chicken Meat Rinses. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 11, 2022.

GURTLER, J. B.; BEUCHAT, L. R. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1579–1586, 2007.

HAKIM, M. *et al.* What is a dark kitchen ? A study of consumer ' s perceptions of delivery-only restaurants using food delivery apps in Brazil. **Food Research International**, v. 161, n. August, 2022.

HAMEED, S.; Xie, L.; Ying, Y. Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 81, n. December 2017, p. 61–73, 2018.

HAN, L. *et al.* Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Fresh Produce: Rapid Determination by Loop-Mediated Isothermal Amplification Coupled with a Propidium Monoazide Treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 7, p. 1–13, 2020.

HAN, S. *et al.* Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in viable but nonculturable state from tomato seed using improved qPCR. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–12, 2018.

HAYMAN, M. M. *et al.* Prevalence of *Cronobacter* spp. And *salmonella* in milk powder manufacturing facilities in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 10, p. 1685–1692, 2020.

HEID, C. A. *et al.* Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, v. 6, p. 986–994, 1996.

HUERTAS, J. P. *et al.* Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behavior in reconstituted powdered infant formula. **Food Research International**, v. 69, p. 401–409, 2015.

IBGE. **Homens e mulheres de 10 anos ou mais por nível de instrução, 2010**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9662-censo-demografico-2010.html?edicao=9753&t=destaques>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

ILHA, E. C. *et al.* Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 597–606, 2016.

INEP. **Censo Educação Superior 2020**. Disponível em: https://download.inep.gov.br/educacao_superior/censo_superior/documentos/2020/tabelas_de_divulgacao_censo_da_educacao_superior_2020.pdf>. Acesso em 10 jan. 2020.

ISHIGE, T. *et al.* Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. **Clinica Chimica Acta**, v. 507, n. April, p. 139–142, 2020.

IVERSEN, C. *et al.* *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., Cro. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1442–1447, 2008.

IVERSEN, C. *et al.* The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: Proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 1–11, 2007.

JANG, H. *et al.* Analysis of the Molecular Diversity Among *Cronobacter* Species Isolated From Filth Flies Using Targeted PCR, Pan Genomic DNA Microarray, and Whole Genome Sequencing Analyses. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. September, 2020.

JAYAN, H.; PU, H.; SUN, D. Trends in Food Science & Technology Recent development in

rapid detection techniques for microorganism activities in food matrices using bio-recognition: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, n. November 2019, p. 233–246, 2020.

JEON, E. B. *et al.* Characterizing the effects of thermal treatment on human norovirus GII . 4 viability using propidium monoazide combined with RT-qPCR and quality assessments in mussels. **Food Control**, v. 109, n. July 2019, p. 106954, 2020.

JOSEPH, S. *et al.* *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1277–1283, 2012.

JU, W.; MOYNE, A.-L.; MARCO, M. L. RNA-Based Detection Does not Accurately Enumerate Living *Escherichia coli* O157:H7 Cells on Plants. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 223, 2016.

KANDHAL, M. C. *et al.* Inactivation rates of *cronobacter* spp. and selected other Bacterial strains in powdered infant formulae stored at different temperatures. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 5, p. 839–848, 2010.

KARACA, B. *et al.* Rapid detection of *Geobacillus* and *Anoxybacillus* species by quantitative qPCR (qPCR) in commercial dairy products. **Journal of Food Safety**, v. 42, n. 2, 2022.

KIM, S. O.; KIM, S. S. Bacterial pathogen detection by conventional culture-based and recent alternative (polymerase chain reaction, isothermal amplification, enzyme linked immunosorbent assay, bacteriophage amplification, and gold nanoparticle aggregation) methods in food samp. **Journal of Food Safety**, v. 41, n. 1, p. 1–12, 2021.

KOOFREH, M. E.; IKPEME, E. V.; MGBADO, T. I. Knowledge, perception, and interest regarding biotechnology among secondary school students in Calabar, Cross River State, Nigeria. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 49, n. 4, p. 664–668, 2021.

KRAGH, M. L.; THYKIER, M.; HANSEN, L. T. A long-amplicon quantitative PCR assay with propidium monoazide to enumerate viable *Listeria monocytogenes* after heat and desiccation treatments. **Journal Of Food Microbiology**, v. 86, n. June 2019, p. 103310, 2020.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–9, 2017.

LACOMBE, A. *et al.* Food safety lessons learned from the COVID-19 pandemic. **Journal of Food Safety**, v. 41, n. 2, p. 1–10, 2021.

LAZOU, T. P. *et al.* Method-Dependent Implications in Foodborne Pathogen Quantification: The Case of *Campylobacter coli* Survival on Meat as Comparatively Assessed by Colony Count and Viability PCR. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 604933, 2021.

LAZOU, T. P. *et al.* Method-Dependent Implications in Foodborne Pathogen Quantification: The Case of *Campylobacter coli* Survival on Meat as Comparatively Assessed by Colony Count

and Viability PCR. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 604933, 2021.

LAZOU, T. P. *et al.* Viability quantitative PCR utilizing propidium monoazide, spheroplast formation, and *Campylobacter coli* as a bacterial model. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 20, 2019.

LEE, E.; Lee, M.; Kim, B. International Journal of Food Microbiology Evaluation of propidium monoazide-quantitative PCR to detect viable *Mycobacterium fortuitum* after chlorine , ozone , and ultraviolet disinfection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 143–148, 2015.

LEIFELS, M. *et al.* Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in environmental and food applications – A systematic review. **Water Research X**, v. 11, p. 100080, 2021.

LI, B.; CHEN, J. Q. Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live *Salmonella* spp. in food. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, 2013.

LI, B.; CHEN, J. Real-Time PCR Methodology for Selective Detection of Viable *Escherichia coli* O157:H7 Cells by Targeting Z3276 as a Genetic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5297–5304, 2012.

LI, C. *et al.* *Cronobacter* spp. isolated from aquatic products in China: Incidence, antibiotic resistance, molecular characteristic and CRISPR diversity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 335, n. April, p. 108857, 2020.

LIANG, T. *et al.* Simultaneous quantitative detection of viable *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter* spp., and *Salmonella* spp. using sodium deoxycholate-propidium monoazide with multiplex real-time PCR. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 4, p. 2954–2965, 2019.

LING, N. *et al.* Rapid and accurate detection of viable *Vibrio parahaemolyticus* by sodium deoxycholate-propidium monoazide-qPCR in shrimp. **Food Control**, v. 109, n. 106883, p. 1–8, 2020.

LIU, Y. *et al.* Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in VBNC state by PMA-combined real-time quantitative PCR coupled with confirmation of respiratory activity. **Food Control**, v. 91, p. 85–91, 2018.

LIU, Y.; Mustapha, A. Detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef by propidium monoazide real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 48–54, 2014.

LOW, W. Y. *et al.* Determinants of food hygiene knowledge among youths: A cross-sectional online study. **Food Control**, v. 59, p. 88–93, 2016.

LV, R. *et al.* Detection and Quantification of Viable but Non-culturable *Campylobacter jejuni*.

Frontiers in Microbiology, v. 10, n. January, p. 1–8, 2020.

LV, X. *et al.* Rapid and absolute quantification of VBNC *Cronobacter sakazakii* by PMAxx combined with single intact cell droplet digital PCR in infant foods. **LWT**, v. 145, n. November 2020, p. 111388, 2021.

LY, V. *et al.* Survival and Virulence of *Listeria monocytogenes* during Storage on Chocolate Liquor, Corn Flakes, and Dry-Roasted Shelled Pistachios at 4 and 238C. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 11, p. 1852–1862, 2020.

MAHMOOD, K. *et al.* An empirical study of food safety, food handling, and food poisoning awareness among foreign students in Penang, Malaysia. **International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology**, v. 8, n. 1, p. 150–156, 2018.

MARKLINDER, I. *et al.* Food safety knowledge, sources thereof and self-reported behaviour among university students in Sweden. **Food Control**, v. 113, n. January, p. 107130, 2020.

MARTIN, B. *et al.* Effect of Amplicon Length in Propidium Monoazide Quantitative PCR for the Enumeration of Viable Cells of *Salmonella* in Cooked Ham. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 683–690, 2013.

MARTÍNEZ, N. *et al.* qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 7, p. 367–376, 2011.

MARTINS, C. P. C. *et al.* How microwave technology is perceived? A food safety cross-cultural study between Brazil and Portugal. **Food Control**, v. 134, n. December 2021, 2022.

MASSARANI, L.; De Castro Moreira, I. Attitudes towards genetics: A case study among Brazilian high school students. **Public Understanding of Science**, v. 14, n. 2, p. 201–212, 2005.

MGQIBANDABA, P. Z. *et al.* Evaluating food safety and hygiene knowledge and practices among foodservice staff of feeding scheme in the primary schools in Soweto, South Africa. **Journal of Food Safety**, v. 40, n. 3, 2020.

MIOTTO, M. *et al.* International Journal of Food Microbiology Optimization of a propidium monoazide-qPCR method for *Escherichia coli* quantification in raw seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 318, n. June 2019, p. 108467, 2020.

MOHAMMED, M. A.; Sallam, K. I.; TAMURA, T. Prevalence, identification and molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* isolated from retail meat products. **Food Control**, v. 53, p. 206–211, 2015.

MOUGIN, J. *et al.* Adhesion to stainless steel surfaces and detection of viable but non cultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* isolated from shrimps in seafood processing environments: Stayin ' alive ? **Food Control**, v. 102, n. December 2018, p. 122–130, 2019.

MSHELIA, A. B.; OSMAN, M.; MISNI, N. B. A cross-sectional study design to determine the prevalence of knowledge, attitude, and the preventive practice of food poisoning and its factors among postgraduate students in a public university in Selangor, Malaysia. **PLoS ONE**, v. 17, n. 1, p. 1–27, 2022.

MUCINHATO, R. M. D. *et al.* Behavioral predictors of household food-safety practices during the COVID-19 pandemic: Extending the theory of planned behavior. **Food Control**, v. 134, n. October 2021, p. 108719, 2022.

MYINTZAW, P.; MORAN, F.; JAISWAL, A. K. Campylobacteriosis, consumer's risk perception, and knowledge associated with domestic poultry handling in Ireland. **Journal of Food Safety**, v. 40, n. 4, p. 1–12, 2020.

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. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 2, p. 310–320, 2006.

NOGVA, H. K. *et al.* Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. **BioTechniques**, v. 34, n. 4, p. 804–813, 2003.

OKADA, A. *et al.* Two-Round Treatment With Propidium Monoazide Completely Inhibits the Detection of Dead *Campylobacter* spp. Cells by Quantitative PCR. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. April, p. 1–7, 2022.

OMS. **Call for data on foodborne outbreak investigations for source attribution on foodborne pathogens.** Disponível em: <https://www.who.int/news-room/articles-detail/call-for-data-on-foodborne-outbreak-investigations-for-source-attribution-on-foodborne-pathogens>. Acesso em: 13 nov. 2023.

OMS. **Coronavirus disease (COVID-19) pandemic.** Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>>. Acesso em: 12 dez. 2021.

OMS. **Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula Guidelines.** Cdc, 2007.

OMS. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.** Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

OPENEPI. **Open source epidemiological statistics for Public Health.** Disponível em: <http://www.openepi.com>>. Acesso em: 12 dez. 2021.

OSAILI, T. M. *et al.* Food safety knowledge and practices among college female students in north of Jordan. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 269–276, 2011.

OSAILI, T. M. *et al.* Survival and growth of *Cronobacter species* (*Enterobacter sakazakii*) in wheat-based infant follow-on formulas. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 408–412, 2009.

OVCA, A.; JEVŠNIK, M.; RASPOR, P. Food safety awareness, knowledge and practices among students in Slovenia. **Food Control**, v. 42, p. 144–151, 1 ago. 2014.

ÖZTÜRK-AKAR, E. Turkish university students' knowledge of biotechnology and attitudes toward biotechnological applications. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 45, n. 2, p. 115–125, 2017.

PAKBIN, B. *et al.* Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of *Cronobacter sakazakii* Strains Isolated from Powdered Infant Formula Milk. **Foods**, v. 11, n. 8, 2022.

PAN, H. *et al.* Quantitative detection of viable but nonculturable state *Escherichia coli* O157:H7 by ddPCR combined with propidium monoazide. **Food Control**, v. 112, n. September 2019, p. 107140, 2020.

PETERSEN, M.; MA, L.; LU, X. Rapid Determination of Viable but Non-culturable *Campylobacter jejuni* in Food Products by Loop-mediated Isothermal Amplification Coupling Propidium Monoazide Treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 351, n. March, p. 109263, 2021.

PHAIR, K. *et al.* Insights into the mechanisms of *Cronobacter sakazakii* virulence. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, n. December 2021, 2022.

PIANTOLA, M. A. F. *et al.* Adopt a Bacterium – an active and collaborative learning experience in microbiology based on social media. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 942–948, 2018.

POSTOLLEC, F. *et al.* Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848–861, 2011.

QIN, H. *et al.* Multiplex real-time PCR coupled with sodium dodecyl sulphate and propidium monoazide for the simultaneous detection of viable *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in milk. **International Dairy Journal**, v. 108, 2020.

RANDAZZO, W. *et al.* Improving efficiency of viability-qPCR for selective detection of infectious HAV in food and water samples. **The Society for Applied Microbiology**, v. 124, p. 958–964, 2017.

RANDAZZO, W. *et al.* International Journal of Food Microbiology Optimization of PMAxx pretreatment to distinguish between human norovirus with intact and altered capsids in shell fish and sewage samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, n. November 2017, p. 1–7, 2018.

RAZAFIMAHEFA, R. M. *et al.* Optimisation of a PMAxxTM - RT - qPCR Assay and the Preceding Extraction Method to Selectively Detect Infectious Murine Norovirus Particles in Mussels. **Food and Environmental Virology**, v. 13, n. 1, p. 93–106, 2021.

REY, M. DE LOS Á. *et al.* High-pressure processing treatment of beef burgers: Effect on *Escherichia coli* O157 inactivation evaluated by plate count and PMA-qPCR. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 6, p. 2324–2336, 2022.

REYNOLDS, J.; JEONG, H.; NAM, C. S. School foodservice directors' national training practices. **Journal of Food Safety**, v. 42, n. 6, 2022.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. *et al.* Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 6, p. 306–319, 2007.

ROUMANI, F. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification combined with immunomagnetic separation and propidium monoazide for the specific detection of viable *Listeria monocytogenes* in milk products, with an internal amplification control. **Food Control**, v. 125, n. November 2020, p. 107–975, 2021.

ROUSSEAU, A. *et al.* Evaluation of propidium monoazide-based qPCR to detect viable oocysts of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 118, n. 3, p. 999–1010, 2019.

RUFÍAN-HENARES, J. Á.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Effect of red sweet pepper dehydration conditions on Maillard reaction, ascorbic acid and antioxidant activity. **Journal of Food Engineering**, v. 118, n. 1, p. 150–156, 2013.

SAEED, B. Q.; OSAILI, T. M.; TAHA, S. Foodborne diseases risk factors associated with food safety knowledge and practices of women in Sharjah-United Arab Emirate. **Food Control**, v. 125, n. August 2020, p. 108024, 2021.

SBBQ. **Hitórico**. Disponível em: <[https://www.sbbq.org.br/historico_495#:~:text=Em 1975%2C o evento começou,em qualidade de trabalhos apresentados.](https://www.sbbq.org.br/historico_495#:~:text=Em%20o%20evento%20começou,em%20qualidade%20de%20trabalhos%20apresentados.)>. Acesso em: 28 out. 2022.

SCARIOT, M. C. *et al.* Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 264, n. August 2017, p. 1–7, 2018.

SEO, K. H.; BRACKETT, R. E. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 59–63, 2005.

SHEKAR, A. *et al.* Selective and concurrent detection of viable *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7, and *Shigella* spp., in low moisture food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 586–593, 2017.

SHI, A. *et al.* Survival of *Salmonella* in Tea Under Different Storage Conditions and Brewing

Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. March, p. 1–8, 2022.

SHI, J. *et al.* A diagnostic assessment for introductory molecular and cell biology. **CBE Life Sciences Education**, v. 9, n. 4, p. 453–461, 2010.

SHIRASAKI, N. *et al.* Suitability of pepper mild mottle virus as a human enteric virus surrogate for assessing the efficacy of thermal or free-chlorine disinfection processes by using infectivity assays and enhanced viability PCR. **Water Research**, v. 186, p. 116409, 2020.

SHUKLA, S. *et al.* Electrochemical coupled immunosensing platform based on graphene oxide/gold nanocomposite for sensitive detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 109, p. 139–149, 30 jun. 2018.

SILVA, J. N. *et al.* Molecular and phenotypical characterization of *Cronobacter* species isolated with high occurrence from oats and linseeds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 1, p. 1–6, 2019.

SOARES, L. S. *et al.* Knowledge, attitudes and practices in food safety and the presence of coagulase-positive staphylococci on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brazil. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 206–213, 2012.

SONG, X.; Shukla, S.; Kim, M. Detection of *Cronobacter* species in powdered infant formula using immunoliposome-based immunomagnetic concentration and separation assay. **Food Microbiology**, v. 72, p. 23–30, 2018.

SOUTHARD, K. *et al.* Features of knowledge building in biology: Understanding undergraduate students' ideas about molecular mechanisms. **CBE Life Sciences Education**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2016.

SOUZA, C. V. S. De; AZevedo, P. R. M. De; Seabra, L. M. A. J. Food safety in Brazilian popular public restaurants: Food handlers' knowledge and practices. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 5, p. 1–9, 2018.

SOUZA, J. L. S. De *et al.* Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 128–139, 2018.

STINGL, K. *et al.* Challenging the “gold standard” of colony-forming units - Validation of a multiplex real-time PCR for quantification of viable *Campylobacter* spp. in meat rinses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 359, 2021.

STOOP, B. *et al.* Development and evaluation of rpoB based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 2, p. 165–168, 2009.

STRYSKO, J. *et al.* Food safety and invasive *Cronobacter* infections during early infancy, 1961-2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 5, p. 857–865, 2020.

SUN, Y. *et al.* Digital PCR assay for the effective detection of COVID-19 patients with SARS-

CoV-2 low viral load. **Journal of Virological Methods**, v. 295, n. November 2020, p. 114185, 2021.

TELLI, A. E.; Dođruer, Y. Discrimination of viable and dead *Vibrio parahaemolyticus* subjected to low temperatures using Propidium Monoazide – Quantitative loop mediated isothermal amplification (PMA-qLAMP) and PMA-qPCR. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, n. April, p. 109–116, 2019.

THANH, M. D. *et al.* Improved sample treatment protocol for accurate detection of live *Salmonella* spp. in food samples by viability PCR. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–12, 2017.

TRUCHADO, P. *et al.* Cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in the viable but non-culturable (VBNC) state during washing of leafy greens and the revival during shelf-life. **Food Microbiology**, v. 109, n. July 2022, p. 3–9, 2023.

TRUCHADO, P. *et al.* Detection and Quantification Methods for Viable but Non-culturable (VBNC) Cells in Process Wash Water of Fresh-Cut Produce: Industrial Validation. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–10, 2020.

UEDA, S. The effects of temperature on the growth and heat resistance of *Cronobacter* spp. **Biocontrol Science**, v. 22, n. 2, p. 125–129, 2017.

UHL, J. D. *et al.* Introductory biology undergraduate students' mixed ideas about genetic information flow. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 49, n. 3, p. 372–382, 2021.

UMESHA, S.; MANUKUMAR, H. M. Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 84–104, 2018.

VAN FRANKENHUYZEN, J. K. *et al.* Molecular pathogen detection in biosolids with a focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, n. 3, p. 263–272, 2011.

VASCONCELLOS, L. *et al.* Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. **Food Research International**, v. 107, n. February, p. 353–359, 2018.

VASCONCELLOS, L. *et al.* Occurrence of total coliforms, *Escherichia coli* and *Cronobacter* species in commercially available 20 l bottled drinking water sold in Rio de Janeiro State, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 431–437, 2019.

VERRUCK, S. *et al.* *Bifidobacterium animalis* spp. lactis BB-12 enumeration by quantitative PCR assay in microcapsules with full-fat goat milk and inulin-type fructans. **Food Research International**, v. 133, n. November 2019, p. 109131, 2020.

VYHNÁNEK, T. *et al.* Molecular detection of fungi in paprika, chili powder and black pepper. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 66, n. 4, p. 927–

937, 2018.

WANG, L. *et al.* Rapid and accurate detection of viable *Escherichiacoli* O157: H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 119–125, 2014.

WANG, Y. *et al.* Detection of viable *Salmonella* in ice cream by TaqMan real-time polymerase chain reaction assay combining propidium monoazide. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 480–485, 2015.

WANG, Y.; SALAZAR, J. K. Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 183–205, 2016.

WARNKEN, M. B. *et al.* Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). **Revista Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 21–31, 2012.

WU, H. *et al.* Progress in molecular detection with high-speed nucleic acids thermocyclers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 190, p. 113489, 2020.

WULSTEN, I. F. *et al.* Chicken Skin Decontamination of Thermotolerant *Campylobacter* spp. and Hygiene Indicator *Escherichia coli* Assessed by Viability Real-Time PCR. **Pathogens**, v. 11, n. 706, p. 1–17, 2022.

WULSTEN, I. F.; GALEEV, A.; STINGL, K. Underestimated Survival of *Campylobacter* in Raw Milk Highlighted by Viability Real-Time PCR and Growth Recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, 2020.

XIE, G. *et al.* Recombinase aided amplification with photoreactive DNA-binding dye for rapid detection of viable *Staphylococcus aureus*. **Lwt**, v. 135, n. September 2020, p. 110249, 2021.

XIE, X.; LIU, Z. Simultaneous enumeration of *Cronobacter sakazakii* and *Staphylococcus aureus* in powdered infant foods through duplex TaqMan real-time PCR. **International Dairy Journal**, v. 117, p. 105019, 2021.

XU, X. *et al.* Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 17–23, 2015.

YANG, X.; BADONI, M.; GILL, C. O. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1478–1482, 2011.

ZENG, D. *et al.* Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–12, 2016.

ZENG, H. *et al.* Prevalence, genetic analysis and CRISPR typing of *Cronobacter* spp. isolated

from meat and meat products in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 321, n. December 2019, p. 108549, 2020.

ZHANG, M. *et al.* Genes involved in tolerance to osmotic stress by random mutagenesis in *Cronobacter malonaticus*. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3851–3858, 2018.

ZHANG, Y. *et al.* Induction of viable but nonculturable *Salmonella* spp. in liquid eggs by mild heat and subsequent resuscitation. **Food Microbiology**, v. 109, n. March 2022, p. 104127, 2023.

ZHANG, Z. *et al.* Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1625–1633, 2015a.

ZHANG, Z. *et al.* Quantifying viable *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* simultaneously in raw shrimp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 15, p. 6451–6462, 2015b.

ZHAO, Y. *et al.* Advances in the detection of virulence genes of *Staphylococcus aureus* originate from food. **Food Science and Human Wellness**, v. 9, n. 1, p. 40–44, 2020.

ZHAO, Y. *et al.* Quantitative polymerase chain reaction coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Streptococcus agalactiae* in milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, p. 1–9, 2019.

ZHENG, Q. *et al.* Growth of healthy and sanitizer-injured *Salmonella* cells on mung bean sprouts in different commercial enrichment broths. **Food Microbiology**, v. 52, p. 159–168, 2015.

ZHI, A. *et al.* Detection of Viable *Vibrio cholerae* Cells in Seafood Using a Real-Time Visual Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with Propidium Monoazide. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 1, p. 99–110, 2018.

ZHOU, B. *et al.* A new application of a sodium deoxycholate-propidium monoazide-quantitative PCR assay for rapid and sensitive detection of viable *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 9550–9559, 2016.

ZHOU, B. *et al.* Rapid and simultaneous quantification of viable *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in milk through multiplex real-time PCR. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 8804–8813, 2017.

ZHOU, H. *et al.* Quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products by duplex droplet digital PCR combined with propidium monoazide. **Food Control**, v. 144, n. March 2022, p. 109353, 2023.

ZHOU, P. *et al.* Rapid and quantitative detection of viable emetic *Bacillus cereus* by PMA-qPCR assay in milk. **Molecular and Cellular Probes**, v. 47, n. August, p. 101437, 2019.

ZI, C. *et al.* An improved assay for rapid detection of viable *Staphylococcus aureus* cells by

incorporating surfactant and PMA treatments in qPCR. **BMC microbiology**, v. 18, n. 1, p. 132, out. 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- TCLE

Caro (a) participante

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar, de forma voluntária, da pesquisa sobre “Avaliação do conhecimento de acadêmicos brasileiros em relação aos métodos baseados em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar”. O presente questionário está associado ao projeto de doutorado da aluna Lúcia Mara dos Reis Lemos, desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis- SC, sob orientação da Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi vinculada à referida instituição.

O Sr. (a) está recebendo um link sobre a pesquisa, contendo o presente documento (TCLE). Após a leitura deste documento, o senhor (a) deverá manifestar concordância com o mesmo, dando o seu consentimento para participar ou não da pesquisa. Estando de acordo com os termos do TCLE, senhor (a) terá acesso ao questionário online e receberá uma cópia por e-mail do TCLE. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e, se desejar, discuta com os pesquisadores, para retirar possíveis dúvidas para sua participação. Se você concordar em participar da pesquisa, terá acesso ao questionário online, o qual você deverá preencher.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

1. Instituição Sede da Pesquisa: Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Endereço: Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil, CEP 88034-000.
2. TÍTULO DA PESQUISA: Avaliação do conhecimento de acadêmicos brasileiros em relação aos métodos baseados em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar
3. PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi
4. PESQUISADORAS ASSISTENTES: Lúcia Mara dos Reis Lemos e Lorena Dutra Silva
5. GARANTIA DE INFORMAÇÃO E DESISTÊNCIA: O senhor (a) será esclarecido (a) sobre a pesquisa no presente documento (TCLE) e em qualquer momento que desejar, antes, durante e após a realização do estudo. Você é livre para participar ou não da pesquisa, para retirar seu consentimento ou interromper a participação, a qualquer momento, basta fechar seu navegador,

sem que isso traga qualquer prejuízo para você. Mesmo que você não queira participar do estudo, não haverá nenhuma desvantagem ou penalidade.

6. **DESCRIÇÃO DO ESTUDO:** Esta pesquisa visa mapear o nível de conhecimento de profissionais e acadêmicos brasileiros em relação aos métodos baseados em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar. Serão avaliados aspectos sobre “Características dos participantes”, “Conhecimentos sobre patógenos de origem alimentar” e “Conhecimentos sobre métodos baseados em PCR”. A sua colaboração poderá auxiliar no avanço do conhecimento científico em relação à temática abordada.

7. **PÚBLICO-ALVO:** Para participar da pesquisa, você deverá ser profissional formado, estudante de graduação ou pós-graduação no Brasil e ser maior de idade (18 anos).

8. **FORMA DE PARTICIPAÇÃO:** O senhor (a) irá receber o link da pesquisa por mensagem enviada pela pesquisadora assistente Lúcia Mara dos Reis Lemos (e-mail: lucinhamaralemos1234@gmail.com) ou mediante e-mail ou divulgação feita pelas redes sociais (Whatsapp, Instagram, Facebook e/ou LinkedIn, por exemplo). Você deverá acessar o link recebido, e então ler atentamente o presente documento (TCLE) até o final. Depois, você deve escolher se vai participar ou não da presente pesquisa. É recomendado que guarde cuidadosamente a mensagem que senhor (a) recebeu via e-mail, contendo o TCLE, pois é um documento com importantes informações de contato e garante os seus direitos como participante da pesquisa.

Este questionário é composto por 35 (trinta e cinco) questões relativas às “Características dos participantes”, tais como: localidade, idade, gênero, formação acadêmica; “Conhecimentos sobre patógenos de origem alimentar” e “Conhecimentos sobre os métodos microbiológicos de detecção de bactérias nos alimentos”. O preenchimento completo do questionário compreenderá um período médio de 5 (cinco) minutos, podendo variar de acordo com o ritmo individual. Você tem o direito de não responder qualquer questão, sem necessidade de explicação ou justificativa para tal, podendo se retirar da pesquisa em qualquer momento. Suas respostas serão registradas e utilizadas como resultado da pesquisa, a fim de identificar o conhecimento de acadêmicos sobre métodos baseados em PCR e patógenos de origem alimentar.

9. **RISCOS:** A presente pesquisa pode apresentar eventuais riscos para o participante sendo estes:

1) risco de cansaço e/ou aborrecimento ao responder os itens propostos no questionário online e eventual constrangimento causado pelas etapas propostas;

2) riscos característicos do ambiente virtual, meios eletrônicos, ou atividades não presenciais, em função das limitações das tecnologias utilizadas;

3) as limitações dos pesquisadores para assegurar total confidencialidade e potencial risco de sua violação, em função da realização da pesquisa em ambiente virtual.

Como forma de minimizar os riscos descritos no item 1, salientamos que o questionário elaborado priorizou questões objetivas de forma clara, com intuito de diminuir possíveis desconfortos e menos tempo no momento do preenchimento. Em relação aos riscos do item 2, podem ser minimizados por meio do contato direto com a pesquisadora Lúcia Mara dos Reis Lemos (e-mail: lucinhamaralemos1234@gmail.com), em que a mesma pode tirar possíveis dúvidas e o envio direto do link do questionário de pesquisa. Os riscos associados ao item 3, os pesquisadores asseguram que serão os únicos que terão acesso aos resultados obtidos, com todo sigilo necessário, porém, existe uma possibilidade remota da quebra de sigilo, mesmo que de forma não intencional, cujas consequências serão tratadas de acordo com a lei.

Durante a pesquisa, a pesquisadora assistente irá se responsabilizar pelo armazenamento adequado dos dados coletados, bem como pelos procedimentos para assegurar o sigilo e a confidencialidade das informações do participante da pesquisa. Uma vez concluída a coleta de dados, a pesquisadora responsável fará o download dos dados coletados para um dispositivo eletrônico local, apagando todo e qualquer registro da plataforma virtual utilizada para a coleta dos mesmos. Seus dados serão mantidos em sigilo e seu nome não será revelado em momento algum. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em eventos ou periódicos científicos da área de Ciência dos Alimentos, resguardando o anonimato de todos os participantes. Caso tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa, o senhor (a) pode solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada. Vale ressaltar que o questionário não apresenta nenhum risco sanitário ou custo, contudo, se assim o quiser, o participante poderá abandoná-lo a qualquer momento - basta fechar a página no seu navegador.

10. BENEFÍCIOS: Ao participar desta pesquisa, o senhor (a) não terá nenhum benefício direto. A legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela participação em pesquisa. Entretanto, espera-se que esta pesquisa contribua para um levantamento nacional com dados relevantes para a comunidade científica.

11. CUSTOS: Você não terá nenhum gasto decorrente no preenchimento do questionário de pesquisa online, uma vez que o material utilizado para a coleta de dados será fornecido pela própria instituição sede da pesquisa. Entretanto, caso você tenha alguma despesa comprovadamente em decorrência da mesma, você será ressarcido de acordo com a resolução CNS 466/12.

12. ESCLARECIMENTOS E DÚVIDAS: Se o senhor (a) tiver alguma dúvida sobre os procedimentos ou sobre o estudo, ou não quiser mais fazer parte do mesmo, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi, (Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rod. Admar Gonzaga, nº 1346 – Itacorubi, Florianópolis/SC, CEP 88034-001), pelo e-mail ana.arisi@ufsc.br ou pelo telefone (48) 37215382. Além disso, você terá a possibilidade de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento ao COMITE DE ÉTICA E PESQUISA COM SERES HUMANOS (CEPSH) da UFSC. O contato com o CEPSH – UFSC pode ser realizado pelo telefone (48) 3721- 6094, pelo e-mail cep.propesq@contato.ufsc.br ou no endereço: Universidade Federal de Santa Catarina – Reitoria II, Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, 4º andar, Sala 401 – Trindade – CEP 88040-400 – Florianópolis/SC.

A pesquisadora responsável, que também receberá uma cópia do TCLE enviado a você, compromete-se a conduzir a pesquisa de acordo com os preceitos éticos e da proteção aos participantes da pesquisa, implicados em estudos envolvendo seres humanos nas Ciências Exatas, Biológicas e da Saúde, conforme normatização da Resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares. Cabe salientar que a referida resolução respalda, também, o formato do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido quando da realização de pesquisas com coleta de dados online, como é o caso desta etapa do estudo. Além disso, este projeto segue as orientações do Ofício Circular nº 2/2021 (CONEP/SECNS/MS) sobre os procedimentos em pesquisas com qualquer etapa em ambiente virtual.

Este projeto foi submetido e aprovado (PARECER: 5.159.538) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH), da Universidade Federal de Santa Catarina, que consiste em um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, que foi criado com o objetivo de defender os interesses dos participantes de pesquisas científicas em sua integridade e dignidade, bem como para contribuir no desenvolvimento da pesquisa de acordo com padrões éticos. Considerando que o senhor (a) leu este documento e que obteve, dos pesquisadores, todas informações necessárias quanto à pesquisa e quanto ao conteúdo do

instrumento (tópicos que serão abordados no questionário), de forma a se sentir esclarecido, solicitamos o seu consentimento livre e espontâneo, expressando a sua participação na pesquisa “Avaliação do conhecimento de acadêmicos brasileiros em relação aos métodos baseados em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar”. Caso o senhor (a) concorde em participar da pesquisa, basta clicar na opção “Concordo”*, sendo que terá, então, acesso ao instrumento (questionário). Caso não concorde em participar, você deverá clicar na opção “Não concordo”*,

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO ONLINE

Você concorda em participar da pesquisa, estando de acordo com o TCLE?

- Concordo (Continua para a próxima seção)
- Não concordo (Continua para a seção 26)

PARTE 1- Características dos participantes

1-Qual é a sua faixa etária?

- 18 a 25 anos;
- 26 a 35 anos;
- 36 a 45 anos;
- 46 a 55 anos;
- Acima de 56 anos.

2-Qual a sua nacionalidade?

- Brasileira;
- Outro.

3-Em que estado do Brasil você reside?

- Acre;
- Alagoas;
- Amapá;
- Amazonas;
- Bahia;
- Ceará;
- Distrito Federal;
- Espírito Santo;
- Goiás;
- Maranhão;
- Mato Grosso;
- Mato Grosso do Sul;
- Minas Gerais;
- Pará;
- Paraíba;
- Paraná;

- Pernambuco;
- Piauí;
- Rio de Janeiro;
- Rio Grande do Norte;
- Rio Grande do Sul;
- Rondônia;
- Roraima;
- Santa Catarina;
- São Paulo;
- Sergipe;
- Tocantins

4-Com qual gênero você se identifica?

- Feminino;
- Masculino;
- Prefiro não responder.
- Outro.

5-Qual seu nível escolar?

- Universitário (graduação incompleta)
- Universitário (graduação completa)
- Pós-graduação (Especialização)
- Pós-graduação (Mestrado)
- Pós-graduação (Doutorado)

6-Qual área do conhecimento pertence o seu curso?

- Ciências Exatas e da Terra
- Ciências Biológicas
- Engenharias
- Ciências da Saúde
- Ciências Agrárias
- Linguística, Letras e Artes
- Ciências Sociais Aplicadas
- Ciências Humanas

7-Qual é o seu curso de graduação?

- Administração
- Agronomia
- Biomedicina
- Ciências Biológicas
- Ciência dos Alimentos
- Economia Domestica
- Educação Física
- Enfermagem
- Engenharia Agrícola
- Engenharia Ambiental e Sanitária
- Engenharia de Alimentos
- Engenharia de Bioprocessos
- Engenharia Civil
- Engenharia de Pesca
- Engenharia Química
- Farmácia
- Fisioterapia
- Física
- Medicina
- Medicina Veterinária
- Nutrição
- Odontologia
- Química
- Tecnologia em Agroindústria
- Tecnologia em Alimentos
- Zootecnia
- Outros _____

8-Se você ainda está cursando a graduação, marque qual período (semestre) você estuda?

- 1° ao 3° semestre
- 4° ao 5° semestre
- 6° ao 7° semestre
- 7° ao último semestre

Já concluí

9-Como você obteve acesso a essa pesquisa?

Facebook

Instagram

WhatsApp

e-mail

Outro

PARTE 2- Conhecimento de patógenos de origem alimentar

Assinale as afirmações a seguir de acordo com seu conhecimento

10-Você cursou ou está cursando a disciplina de microbiologia?

Sim, estou cursando

Sim, já cursei

Não

11-Você sabe o que significa intoxicação alimentar?

Sim *Não* *Não sei*

12-Se você marcou sim, assinale o que caracteriza intoxicação alimentar.

Ocorre por meio da ingestão de um alimento que contenha organismos prejudiciais à saúde.

Ocorre quando uma pessoa ingere alimentos com substâncias tóxicas, incluindo as toxinas produzidas por microrganismos, como bactérias e fungos.

Ocorre pela ingestão de alimentos que apresentam organismos prejudiciais à saúde e que liberam substâncias tóxicas no organismo.

13-Você conhece um patógeno de origem alimentar?

Sim *Não*

14- Se você marcou sim, assinale quais microrganismos a seguir, são patógenos de origem alimentar

Staphylococcus aureus

Saccharomyces cerevisae

Campylobacter jejuni

Bacillus cereus

Salmonella

Lactobacillus paracasei

Clostridium perfringens

Echerichia coli

Bifidobacterium animalis

15- Microrganismos patogênicos de origem alimentar tem efeitos prejudiciais à saúde humana.

Sim Não Não sei

16- Pessoas saudáveis podem ser portadoras de patógenos que podem causar doenças transmitidas por alimentos.

Sim Não Não sei

Questão de verificação: Nessa questão você deve marcar a opção que contém o número "19" (resposta incorreta nessa questão anulará todo questionário)

21

19

17

15

17-Microrganismos patogênicos podem causar morte entre seres humanos com imunidade baixa.

Sim Não Não sei

18-Os microrganismos patogênicos que causam doenças podem ser detectados por análises microbiológicas em laboratório.

Sim Não Não sei

19-A análise microbiológica utilizando semeadura em meio de cultivo é a forma mais rápida e menos trabalhosa de detectar bactérias patogênicas em alimentos.

Sim Não Não sei

PARTE 3- Conhecimentos sobre métodos baseados em PCR

20- Na sua graduação você estudou sobre técnicas de biologia molecular?

Sim

Não

21- Você sabe citar uma técnica de biologia molecular?

Sim

Não

22- Se você respondeu sim na questão anterior, cite uma técnica de biologia molecular.

23- Você entende sobre o funcionamento do método de PCR?

Sim Não

24- Em uma escala de 1 a 5, indique qual é o seu nível de entendimento sobre o método de PCR

1-Nenhum entendimento

2-Pouco entendimento

3-Moderado entendimento

4-Muito entendimento

5-Muitíssimo entendimento

25- Em qual local você foi informado como funciona o método de PCR?

Na escola durante o ensino médio;

Durante a graduação;

Durante a pós-graduação;

Notícias através dos meios de comunicação, tais como *internet*, jornal, internet, Tv e rádio;

Artigo científico;

No teste de Covid-19;

Nunca ouvir falar.

26- Os patógenos que contaminam os alimentos podem ser detectados a partir de pequenas quantidades de DNA?

Sim Não Não sei

27- A amplificação de DNA pela reação em cadeia da DNA polimerase, também conhecida como técnica de PCR, pode detectar patógenos em alimentos.

Sim Não Não sei

28- O princípio da técnica de PCR baseia-se em ciclos de síntese de DNA, onde cada ciclo é constituído por três etapas, denominadas de desnaturação, anelamento e extensão.

Sim Não Não sei

29- A revelação dos resultados da técnica de PCR convencional pode ser feita por eletroforese em gel de agarose.

Sim Não Não sei

30-A técnica de PCR apenas pode detectar a bactéria *Escherichia coli* em alimentos cárneos.

Sim Não Não sei

31-A Taq DNA polimerase é uma enzima termoestável utilizada na técnica de PCR convencional.

Sim Não Não sei

32-Milhões de cópias de um fragmento podem ser obtidas a partir de um DNA molde em sucessivos ciclos durante a execução da técnica de PCR.

Sim Não Não sei

33- A técnica de PCR quantitativa (qPCR) é uma técnica usada não só na detecção qualitativa, mas também na quantificação do DNA de patógenos em alimentos.

Sim Não Não sei

34-A reação em cadeia da DNA polimerase permite à amplificação *in vitro* de pequenas quantidades de DNA de patógenos de origem alimentar.

Sim Não Não sei

35- PCR em tempo real é um sistema que identifica e quantifica determinado fragmento de DNA presente em uma amostra de alimentos.

Sim Não Não sei

ANEXOS

ANEXO A – PÁGINA INICIAL DO ARTIGO “VIABILITY DYES QUANTITATIVE PCR (vPCR) ASSAYS TARGETING FOODBORNE PATHOGENS - SCIENTIFIC PROSPECTING (2010–2022)”

Microchemical Journal 197 (2024) 109769



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc



Viability dyes quantitative PCR (vPCR) assays targeting foodborne pathogens - scientific prospecting (2010–2022)

Lúcia Mara dos Reis Lemos, Ana Carolina Maisonnave Arisi^{*}

CAL CCA UFSC, Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Foodborne pathogens
Monoazide propidium
Quantitative PCR
Microbial viability

ABSTRACT

This prospective review aims to map published assays using viability dyes combined with qPCR (vPCR) to detect viable cells or capsid integrity of pathogens, focusing on food analysis. Studies in the period 2010–2022 were identified in web databases. This scientific foresight study summarizes information on the number of publications, vPCR assays carried out in recent years, and the main target foodborne pathogen species. When using the search terms (“viability dyes” OR “PMA”) AND “quantitative PCR” AND “Foodborne pathogens”, 441 documents were found, of which 288 scientific articles. Among the scientific articles in our search using these keywords, 58 articles refer to the vPCR use for foodborne pathogens detection. Scientific papers on vPCR assays primarily target the following foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, and *Cronobacter sakazakii*, which pose problems for food safety and public health. Challenges for vPCR assay are the optimization of intercalating dye concentration and light exposure conditions for different food matrices. The interference of non-target microorganisms should be considered for food samples containing high microorganisms load.

ANEXO B – PÁGINA INICIAL DO ARTIGO “KNOWLEDGE ABOUT FOODBORNE PATHOGENS AND PCR-BASED MICROBIAL DETECTION METHODS AMONG BRAZILIAN STUDENTS AND PROFESSIONALS: A SURVEY”


Received: 29 March 2023 | Revised: 7 June 2023 | Accepted: 25 June 2023

DOI: 10.1111/jfs.13078

ORIGINAL ARTICLE

Journal of
Food Safety  WILEY

Knowledge about foodborne pathogens and PCR-based microbial detection methods among Brazilian students and professionals: A survey

Lúcia Mara dos Reis Lemos | Lorena Dutra Silva | Ana Carolina Maisonnave Arisi 

Food Science and Technology Department,
CAL CCA UFSC, Federal University of Santa
Catarina, Florianópolis, Brazil

Correspondence

Ana Carolina Maisonnave Arisi, Food Science
and Technology Department, CAL CCA UFSC,
Federal University of Santa Catarina, Rod.
Admar Gonzaga, 1346, Florianópolis, Santa
Catarina 88034-001, Brazil.
Email: ana.arisi@ufsc.br

Funding information

Coordination for the Improvement of Higher
Education Personnel (CAPES), Ministry of
Education, Brazil; National Council for
Scientific and Technological Development
(CNPq), Ministry of Science, Technology and
Innovation, Brazil, Grant/Award Number:
303085/2019-3

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR) is widely used in several research areas and routine laboratory analyses, including foodborne pathogens detection. We aimed to investigate the knowledge about PCR-based methods and foodborne pathogens among undergraduate and graduate Brazilian students and professionals. A cross-sectional survey was carried out using an online questionnaire as data collection method. The questionnaire was validated and distributed through email and social networks. Data from 1246 respondents was collected. The knowledge scores were verified by correspondence analysis and discussed, 75.8% of the participants answered that they knew a foodborne pathogen and 71.4% of the participants answered that they did not study molecular biology techniques during undergraduate course. The highest level of knowledge was found among professionals with Masters' and PhD degrees. In conclusion, participants are not knowledgeable about PCR-based methods and the level of academic training influences the knowledge of analytical foundations. Most participants did not study PCR and its application in detecting foodborne pathogens during undergraduate course. We suggested that undergraduate courses in Food Engineering and in Food Science and Technology include mandatory molecular biology classes in academic programs.

1 | INTRODUCTION

Molecular biology involves the research of nucleic acids and has evolved from studying individual genes to biological systems. Molecular biology techniques are used in a wide variety of fields; among them, the polymer-

sensitivity (Aschenbrenner & Marx, 2017; Kralik & Ricchi, 2017; Wu et al., 2020). Quantitative PCR (qPCR) is used to quantify the target DNA sequence by monitoring the DNA amplification process in real time using fluorescent intercalators. The qPCR is advantageous since the results are obtained quickly, reducing the contamination risk, thus becoming a valu-

ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do conhecimento de acadêmicos brasileiros em relação aos métodos baseados em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar

Pesquisador: ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 53008021.0.0000.0121

Instituição Proponente: CCA - Centro de Ciências Agrárias

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.159.538

Apresentação do Projeto:

As informações que seguem e as elencadas nos campos "Objetivo da pesquisa" e "Avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_...pdf, de 23/11/2021, preenchido pelos pesquisadores.

Segundo os pesquisadores:

Resumo:

A reação em cadeia da polimerase (do inglês polymerase chain reaction PCR) é um método molecular utilizado em diversas áreas que necessitam de diagnósticos rápidos e confiáveis, a partir de pequenas quantidades de DNA. No setor alimentício, tem ganhado espaço, pois esta tecnologia tem por objetivo

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade

CEP:88.040-400

UF: SC

(48)3721-6094

Município: FLORIANOPOLIS

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

garantir a segurança do alimento ao longo da cadeia produtiva, por meio da detecção de microrganismos patogênicos. O conhecimento desta técnica, passou a ser disseminado em diversos segmentos de formação acadêmica, e vem crescendo de maneira exponencial, demandando constante atualização. Desta forma, o objetivo do presente estudo é mapear o nível de conhecimento de acadêmicos brasileiros em relação aos métodos baseados em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar. Para coleta de dados, será aplicado um questionário online (Google Forms), com a participação voluntária de estudantes da graduação e pós-graduação do Brasil. O questionário apresenta 25 questões, sobre “Características dos participantes”, “Conhecimentos sobre patógenos de origem alimentar” e “Conhecimentos sobre métodos baseados em PCR. Diante do exposto, espera-se avaliar o nível de conhecimento dos respondentes a respeito dos métodos baseados em PCR e obter informações da compreensão sobre os patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos.

Hipótese:

-Não há associação entre o conhecimento dos métodos baseados em PCR com a formação acadêmica. -Os métodos baseados em PCR para detectar patógenos de origem alimentar são conhecidos entre os acadêmicos brasileiros.

Metodologia Proposta:

Questionário online Para sua abordagem, o questionário online será disponibilizado via e-mail, redes sociais (Facebook, Instagram e LinkedIn) e WhatsApp. Os acadêmicos brasileiros, com idade acima de 18 anos, serão convidados a responder ao questionário de forma voluntária. O público alvo será estudantes de graduação ou pós-graduação, que tenham cursado na sua formação acadêmica, a disciplina de microbiologia. O formulário apresenta perguntas formuladas pelos pesquisadores e questões adaptadas de outros estudos publicados anteriormente (MARKLINDER et al., 2020; SIDDIKY et al., 2022). Após o preenchimento do TCLE (Apêndice A), permitindo seu consentimento

em participar da pesquisa, o participante terá acesso ao formulário com as perguntas. O questionário apresenta 25 perguntas organizadas nas seguintes partes: parte 1. “Características dos participantes” (9 perguntas), tais como: localidade, idade, gênero, formação acadêmica; parte 2. “Conhecimentos sobre patógenos de origem

alimentar” (6 perguntas) e parte 3. Conhecimentos sobre métodos baseados em PCR (10 perguntas) (Apêndice B). 2.3 Análise estatística O nível de conhecimento dos acadêmicos brasileiros será avaliado de acordo com Soares et al. (2012). Para cada resposta correta, será atribuído um ponto, enquanto a resposta incorreta ou a afirmação “não sei” receberão zero ponto. Os estudantes que obtiverem pontuação inferior a 70% de acerto

serão considerados como de “conhecimento insuficiente” e aqueles com pontuação igual ou superior a 70% de acertos serão considerados como de “bom conhecimento”. A análise dos dados será realizada por meio do software SPSS for Windows, por meio do uso da estatística descritiva (frequências,

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala

Bairro: Trindade

UF: SC
(48)3721-6094

Município: FLORIANOPOLIS

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

porcentagens) para sintetizar as características dos respondentes; e teste do qui-

Continuação do Parecer: 5.159.538

quadrado de Pearson para verificar a associação entre o nível de formação dos estudantes e o conhecimento sobre bactérias patogênicas de origem alimentar e metodologias de detecção. Resultados com valor de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Mapear o nível de conhecimento de estudantes universitários brasileiros em relação aos métodos baseados em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar.

Objetivo Secundário:

Identificar o nível de conhecimento, sobre as técnicas de detecção baseadas em PCR, por partes de estudantes universitários e pós-graduandos que cursaram microbiologia na sua formação;

Verificar a compreensão dos respondentes a respeito dos patógenos de origem alimentar que causam doenças transmitidas por alimentos;

Associar o nível formação acadêmica dos acadêmicos ao conhecimento dos métodos baseados em PCR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A presente pesquisa pode apresentar eventuais riscos para o participante sendo estes: 1) risco de cansaço e/ou aborrecimento ao responder os itens propostos no questionário online e eventual constrangimento causado pelas etapas propostas; 2) riscos característicos do ambiente virtual, meios eletrônicos, ou atividades não presenciais, em função das limitações das tecnologias utilizadas; 3) as limitações dos pesquisadores para assegurar total confidencialidade e potencial risco de sua violação, em função da realização da pesquisa em ambiente virtual. Como forma de minimizar os riscos descritos no item 1, salientamos que o questionário elaborado priorizou questões objetivas de forma clara, com intuito de diminuir possíveis desconfortos e menos tempo no momento do preenchimento. Em relação aos riscos do item 2, podem ser minimizados por meio do contato direto com a pesquisadora Lúcia Mara dos Reis Lemos (e-mail: lucinhamaralemos1234@gmail.com), em que a mesma pode tirar possíveis dúvidas e o envio direto do link do questionário de pesquisa. Os riscos associados ao item 3, os pesquisadores

Continuação do Parecer: 5.159.538

asseguram que serão os únicos que terão acesso aos resultados obtidos, com todo sigilo necessário, porém, existe uma possibilidade remota da quebra de sigilo, mesmo que de forma não intencional, cujas consequências serão tratadas de acordo com a lei.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala

Bairro: Trindade

UF: SC
(48)3721-6094

Município: FLORIANOPOLIS

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Durante a pesquisa, a pesquisadora assistente irá se responsabilizar pelo armazenamento adequado dos dados coletados, bem como pelos procedimentos para assegurar o sigilo e a confidencialidade das informações do participante da pesquisa. Uma vez concluída a coleta de dados, a pesquisadora responsável fará o download dos dados coletados para um dispositivo eletrônico local, apagando todo e qualquer registro da plataforma virtual utilizada para a coleta dos mesmos. Seus dados serão mantidos em sigilo e seu nome não será revelado em momento algum. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em eventos ou periódicos científicos da área de Ciência dos Alimentos, resguardando o anonimato de todos os participantes. Caso tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa, o senhor (a) pode solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada. Vale ressaltar que o questionário não apresenta nenhum risco sanitário ou custo, contudo, se assim o quiser, o participante poderá abandoná-lo a qualquer momento - basta fechar a página no seu navegador.

Benefícios:

Ao participar desta pesquisa, o senhor (a) não terá nenhum benefício direto. A legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela participação em pesquisa. Entretanto, espera-se que esta pesquisa contribua para um levantamento nacional com dados relevantes para a comunidade científica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Informações retiradas primariamente do formulário com informações básicas sobre a pesquisa gerado pela Plataforma Brasil e/ou do projeto de pesquisa e demais documentos postados, conforme lista de documentos e datas no final deste parecer.

Projeto de doutorado da aluna Lúcia Mara dos Reis Lemos, desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis- SC, sob orientação da Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi.

Estudo qualitativo que pretende mapear o nível de conhecimento de acadêmicos brasileiros em

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala

Bairro: Trindade

UF: SC
(48)3721-6094

Município: FLORIANOPOLIS

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 5.159.538

relação aos métodos baseados em PCR para detecção de patógenos de origem alimentar. Para coleta de dados, será aplicado um questionário online (Google Forms), com a participação voluntária de estudantes da graduação e pós-graduação do Brasil. O questionário apresenta 25 questões, sobre “Características dos participantes”, “Conhecimentos sobre patógenos de origem alimentar” e “Conhecimentos sobre métodos baseados em PCR. O TCLE atende na íntegra a Resolução CNS 466/12.

Financiamento: [próprio].

País de origem: [Brasil].

Número de participantes no Brasil: [1500].

Previsão de início da coleta de dados: [03/01/2022 30/04/2022 a no formulário PB].

Previsão de término do estudo: [01/05/2022 a 31/05/2022 no formulário PB].

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações."

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto sem pendências ou inadequações, pela aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1840742.pdf	23/11/2021 09:48:05		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_assinado.pdf	23/11/2021 09:47:04	ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI	Aceito
Outros	folhaDeRosto_projeto_Ana_Arisi_assinado.pdf	23/11/2021 09:46:39	ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoeditada_assinado_assin	13/10/2021	ANA CAROLINA	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala

Bairro: Trindade

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

(48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 5.159.538

Folha de Rosto	ado.pdf	15:27:01	MAISONNAVE ARISI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	13/10/2021 15:26:04	ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	13/10/2021 15:25:28	ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI	Aceito
Outros	CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO_DO_PROJETO_assinado.pdf	08/10/2021 17:13:16	ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI	Aceito
Orçamento	ORCAMENTOFINANCEIRO.docx	08/10/2021 17:10:53	ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_assinado.pdf	08/10/2021 17:09:53	ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisadores_assinado_assinado_assinado.pdf	08/10/2021 17:07:13	ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 10 de
dezembro de 2021

Assinado por:

Nelson Canzian da Silva

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala

Bairro: Trindade

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

(48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br