Capítulo 77
DOI: 10.53934/agronfy-2025-01-77

NOVOS MÉTODOS APLICADOS À ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS: UMA REVISÃO

Alisson Melo de Sousa; Mirla Dayanny Pinto Farias;Francisca Joyce Elmiro Timbó Andrade; Georgia Maciel Dias de Moraes; Daniele Maria Alves Teixeira Sá; Francisca Lidiane Linhares de Aguiar; Leiliane Teles César*
**Autor correspondente (Corresponding author) – Email:leilianeteles@ifce.edu.br*

Resumo: As análises microbiológicas de alimentos são fundamentais na detecção e quantificação de microrganismos, indicadores ou patógenos, que justificam intervenções direcionadas à saúde pública, segurança dos alimentos, conformidade regulatória e controle de qualidade. Nesta revisão foi possível identificar técnicas que trazem vantagens em termos de rapidez, especificidade, identificação microbiana e de compostos em alimentos. O avanço da tecnologia aplicada à biologia molecular possibilitou a evolução da microbiologia, resultando em testes cada vez mais específicos, sensíveis e acessíveis, embora sempre haja lugar para os métodos tradicionais, a aplicação da microbiologia adapta-se às necessidades da indústria e da pesquisa. Os métodos microbiológicos rápidos fornecem várias vantagens, principalmente, em relação à agilidade dos resultados de análises. As técnicas de PCR e PCR em tempo real são bastante usadas para detectar com sucesso patógenos bacterianos importantes, como *Salmonella* spp e *Campylobacter* sp. Portanto, as atuais técnicas moleculares (PCR, qPCR, biossensores, *microarrays* e LFA) contribuem com maior eficácia, seletividade e especificidade às análises microbiológicas e são empregadas em diferentes setores, tanto na indústria como na pesquisa, gerando resultados mais rápidos e menos onerosos, tornando-as alternativas viáveis para detecção de compostos e microrganismos para garantia da qualidade e segurança do alimento.

Palavras–chave: segurança dos alimentos; análise microbiológica; patógenos; métodos rápidos; microrganismos indicadores

INTRODUÇÃO

As análises microbiológicas de alimentos desempenham papel crucial na detecção e quantificação de microrganismos, indicadores ou patógenos, que justificam intervenções direcionadas à saúde pública, segurança dos alimentos, conformidade regulatória e controle de qualidade. A Organização Pan-Americana de saúde (OPAS) estima que, na região das Américas, a cada ano, 77 milhões de pessoas sofrem de doenças transmitidas por alimentos (DTA´s) e mais de 9.000 morrem (1). Desta forma, as análises microbiológicas de alimentos auxiliam na saúde do consumidor, na integridade do abastecimento alimentar e prevenção de DTA´s (1).

As análises para detecção de microrganismos em alimentos, embora sejam confiáveis e eficientes, necessitam de vários dias para obtenção dos resultados, tornando o custo de análise muito elevado, pois é utilizada uma grande quantidade de determinações microbiológicas. Estas análises baseiam-se na aplicação de testes

morfológicos e bioquímicos a fim de realizar a identificação e determinação de gêneros, espécies e subespécies de microrganismos, sendo realizados em meios não-seletivos e/ou seletivos de cultura, sendo complementados por testes bioquímicos diferenciais associados a testes sorológicos. Assim, quando realizados testes limitados com capacidade discriminatória reduzida em microrganismos, que apresentam variabilidade genética baixa, existe a possibilidade de interpretações equivocadas dos resultados (2).

Os recentes avanços tecnológicos possibilitaram o desenvolvimento de vários métodos para detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Dentre eles destaca-se as técnicas baseadas na replicação de sequências de DNA pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) e seus avanços. Esta se tornou a técnica genética mais utilizada em diagnóstico microbiológico durante as últimas décadas. Além dos métodos moleculares, outras tecnologias baseadas em espectrometria de massa, biossensores, bem como, em *microarrays* e testes rápidos ganham destaque no cenário das análises microbiológicas para alimentos (3).

O emprego de novos métodos de análise de alimentos apresenta-se como alternativa interessante, por diversos propósitos, incluindo a construção de tabela nutricional, controle de qualidade e contaminação, pois as indústrias e estabelecimentos alimentícios precisam de métodos rápidos e acessíveis para a determinação de compostos que não possuem um método adequado para monitoramento ou mesmo para substituir os métodos onerosos e lentos já existentes (4).

Apesar do aumento da utilização das técnicas de análise rápida em estudos de microbiologia de alimentos, as publicações ainda são limitadas. Assim, este trabalho tem como objetivo apresentar uma visão geral dos novos métodos microbiológicos, discutindo sua aplicação e abordando as vantagens e desafios desses métodos de interesse em alimentos.

Principais métodos rápidos aplicados à análise microbiológica de alimentos

Para uma melhor compreensão das novas técnicas moleculares é importante se conhecer os princípios básicos da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que pode ser aplicada na identificação de genótipos ou na ampliação, detecção e diagnóstico da presença de patógenos em diferentes alimentos. Além disto, a PCR pode fazer parte do fluxo de trabalho de outras técnicas de análise em tempo real.

Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica *in vitro* que amplifica o DNA, gerando milhões de cópias de um segmento específico de DNA a partir de uma pequena quantidade de material inicial. Esta técnica foi desenvolvida inicialmente em 1985 por Kary B. Mullis, possibilitando um grande avanço nas técnicas de biologia molecular, devido à resolução de dois grandes problemas da pesquisa com biomoléculas daquela época, a amplificação e replicação de um fragmento específico de DNA (3).

Esta reação tem se transformado nas últimas décadas em um instrumento de pesquisa altamente especializado, o qual se caracteriza em uma técnica aplicada em diversos laboratórios. Áreas como microbiologia, imunologia, oncologia, genética,

medicina forense, transplantes de órgãos, detecção de microrganismos, controle de qualidade de alimentos, entre outras foram beneficiadas pela PCR (5).

A reação em cadeia da polimerase consiste, normalmente, em depositar reagentes necessários para que as moléculas alvo sejam replicadas em um tubo de ensaio de 0,2–0,5 µl. Nestes são inseridos o DNA alvo, a enzima DNA polimerase para síntese de fita complementar, os nucleotídeos usados como unidade básica para o processo de síntese da fita, os *primers* (oligonucleotídeos de DNA) usados para garantir a especificidade das extremidades das fitas e os íons bivalentes (MG2+) como cofator da DNA polimerase (3).

Após criar um meio propício para que a reação ocorra, a PCR é divida em uma série de três ciclos principais com variação de temperatura entre eles. Na primeira etapa ocorre a desnaturação do DNA de fita dupla por calor, ou seja, as pontes de hidrogênio que conectam e a fita dupla de DNA se rompem quando submetidas à, aproximadamente, 95 ºC por alguns segundos, dando origem a duas fitas simples (6).

A segunda etapa ou Anelamento tem como objetivo a ativação dos *primers* específicos que irão complementar as extremidades das fitas do fragmento do DNA alvo. Assim, o ideal é conhecer a sequência de nucleotídeos específicos das extremidades desta amostra. Desta forma, depois de reduzida a temperatura para aproximadamente 60 ºC, os *primers* irão se associar ao fragmento específico da fita de DNA (3).

Já na terceira etapa ou Extensão ocorre a atuação da enzima DNA polimerase adicionando nucleotídeos, disponibilizados no início da reação, para prosseguir na construção (3´- 5´ e 5´- 3´) do restante da fita de DNA com base nas extremidades complementadas pelos *primers*. Recomenda-se que esta etapa ocorra com temperatura em torno de 70 ºC, pois, permite maior estabilidade e ativação da DNA polimerase (6).

Em resumo, cada ciclo inclui a desnaturação de fita dupla de DNA, a hibridização de dois oligonucleotídeos de DNA (*primers*) complementando a sequência alvo e o alongamento desses *primers* por uma DNA polimerase, permitindo a replicação exponencial do DNA alvo.

Teoricamente, a reação deve ser ciclada de 20 a 40 vezes. Na prática, o processo de amplificação satura e atinge uma fase de constância à medida que os nucleotídeos e os reagentes da PCR se esgotam. A termociclagem é realizada através de uma máquina denominada Termociclador. Atualmente, estes aparelhos são bastante modernos, possuindo blocos térmicos para acomodar múltiplos tubos e são controlados por *softwares* que permitem a programação de variados ciclos e perfis térmicos. Os aparelhos mais avançados permitem a quantificação do DNA em tempo real (3).

Após realização da PCR, uma das maneiras de avaliar seu resultado é observando a migração e separação de partículas sob a influência de um campo elétrico em uma matriz permeável através da eletroforese. Assim, as moléculas são separadas de acordo com o peso molecular, onde a velocidade de migração do fragmento de DNA é determinada pelo seu tamanho. Entretanto, a visualização das partículas (bandas na eletroforese) só é possível com a utilização de um corante específico para gerar a fluorescência em luz ultravioleta. Por fim, este resultado é registrado como imagem (7).

Na área de alimentos, várias investigações foram realizadas com a utilização da técnica PCR para a identificação de patógenos (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* ssp. e vários outros microrganismos). A utilização desta técnica para *Campylobacter* é direcionada aos genes flaA, CadF, ceuE, cdt e a região 16S rRNA (RNA ribossomal) que possibilita a identificação de iniciadores específicos que servirão para dar continuidade a sequência reversa complementar das espécies de *Campylobacter* ssp (8, 9,10).

Arguello (11) identificou que oito genes patogênicos de *Campylobacter jejuni* circulavam em todas as linhas de abate avícolas no estado brasileiro do Rio Grande do Sul. Então, a identificação do patógeno é importante para a redução da proporção de aves infectadas e das carcaças de frangos de corte com *C. jejuni* nos matadouros, diminuindo o risco de contaminação aos consumidores e possibilitando o desenvolvimento de tratamentos eficazes (11).

Da mesma forma, análises baseadas em PCR têm sido usadas para identificação de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em diferentes amostras de alimentos, como leite e vegetais. Souza (12) observou em sua pesquisa presença deste microrganismo em 9,33% (14 de 150 amostras) das amostras de melão e sua ausência nas amostras de jabuticaba, adquiridas no comércio varejista do Município de Viçosa – MG, Brasil. Em pesquisa com vegetais prontos para consumo em Portugal, não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* (13).

A *Salmonella* é considerada como principal causa de infecção alimentar em humanos por todo o mundo. Com a utilização da PCR convencional foram detectados em 09 de 36 de amostras microbiológicas positivas de *Salmonella* spp. em frango caipira por meio do gene invA. Assim, o gene invA permite um diagnóstico rápido e confiável de *Salmonella* spp. nas amostras quando comparado com amostras avaliadas pelos métodos culturais e bioquímicos tradicionais (14, 15).

Portanto, diversas pesquisas têm sido descritas com a utilização de técnicas fundamentadas em PCR na detecção direta de microrganismos em alimentos. Alguns destes testes estão disponíveis comercialmente e são certificados pela FDA e AOAC.

PCR em tempo real ou qPCR

Uma limitação da reação PCR tradicional está relacionada à característica qualitativa desta técnica, limitando os estudos quantitativos. Em função disso, desenvolveu-se uma nova metodologia denominada de PCR em tempo real (*Real Time* PCR). Esta técnica é baseada na PCR tradicional associada à utilização de processos químicos automatizados de monitoramento do acúmulo de produtos de PCR em uma reação, em tempo real, através da adição de agentes químicos fluorescentes (3).

Através de sistema informatizado com *software* é feita a separação, quantificação e interpretação do espectro gerado, realizando assim a distinção e quantificação de mais de um fluoróforo, que por sua vez permite a detecção de mais de um DNA alvo. Assim, para obtenção destes resultados é necessária utilização de Termociclador de PCR em tempo real para termociclar, ativar o agente fluorescente, filtrar e detectar a variação no nível de fluorescência, bem como, traduzir o sinal fluorescente em resultado quantitativo digital (16).

A intensidade da fluorescência da amostra aumenta proporcionalmente com o aumento do número de cópias do DNA alvo, deste modo é possível quantificar o resultado da PCR. Duas tecnologias de PCR, em tempo real, destacam-se atualmente, a *SYBR Green Real-Time* PCR e a 5'- *Nuclease Real-time* PCR. Na primeira tecnologia, são utilizados nucleotídios ligados a sondas SYBR *Green* para quantificar produtos de PCR. Durante a extensão, o SYBR *Green* se conecta a fita dupla de DNA e emite um sinal fluorescente que é detectado pelo equipamento de qPCR. Por ser um agente inespecífico intercalante de DNA de fita dupla é necessário realizar uma curva de dissociação para verificar se o resultado é fidedigno, adicionando mais uma etapa ao fim da qPCR (3).

Esta curva mede a dissociação de SYBR *Green* do dsDNA em altas temperaturas. O pico ou temperatura de *Melting* de um fragmento de DNA depende do seu tamanho e

proporção entre G/A e A/T. Se a amostra apresenta uma única sequência de DNA (produzida a partir de um par de *primers* específico) resultará em um único pico (linha preta) na temperatura de *Melting*. Já múltiplas sequências de DNA ou dímeros de *primers* resultarão em dois ou mais picos (roxo) e indicam *primers* não específicos (6).

A segunda tecnologia, conhecida como sondas TaqMan, está fundamentada na atividade 5'- 3' exonucleolítica da enzima TaqDNA Polimerase, em que durante a mistura de reação é composta por sondas fluorogênicas, formadas pela associação de um oligonucleotídio de sequência específica com um fluoróforo, denominado *Reporter* e um inibidor de fluorescência, conhecida como molécula *Quencher*. Após se conectar a sequência específica do DNA alvo a enzima TaqDNA Polimerase vai quebrar este oligonucleotídio especíco desmembrando a molécula *Quencher*. Assim, o agente fluorescente consegue emitir fluorescência quando ligado a molécula do DNA alvo. A sonda TaqMan pode emitir diferentes comprimentos de luz, possibilitando realizar a detecção de diferentes DNA´s alvo, quantificando-os de forma simultânea (6).

Diante disto, é possível verificar dois tipos de análise, a qualitativa e a quantitativa, que são representadas pelo tipo de curva no gráfico. A fase exponencial representa a fase mais eficiente de amplificação e a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo se a eficiência da amplificação for de 100%. A fase de platô (linear) representa o momento onde quase não há amplificação do DNA, devido escassez de reagentes e acúmulo de subprodutos deixando o meio desfavorável para que a reação aconteça (6).

A análise qualitativa é obtida através da fase platô no gráfico, esta apenas indica se há presença ou ausência da amplificação do DNA alvo. Este tipo de resultado e suas aplicações podem ser obtidos também através da PCR convencional. Já o método quantitativo (qPCR) permite verificar quantos ciclos foram necessários para a fluorescência atingir o Ciclo *Threshold* de diferentes DNA's alvo, suas respectivas concentrações iniciais, eficiência da reação e número de cópias, ao mesmo tempo, através da fase exponencial. Quando conhecidos os resultados de uma das amostras é possível realizar a quantificação relativa das outras amostras usando dados da fase exponencial (6).

Portanto, a qPCR pode ser aplicada com o objetivo de identificar alelos de DNA genômico; analisar sequências virais, bacterianas e protozoárias a partir de várias fontes; diagnosticar doença com rapidez no resultado; analisar produtos transgênicos e analisar patógenos em alimentos de forma rápida. Assim, a PCR em tempo real na análise de alimentos permite que as etapas de amplificação e detecção ocorram simultaneamente, possibilitando a visualização dos resultados sem a necessidade de processamento após a amplificação, evitando contaminação e garantindo economia de tempo e custo (17).

A Embrapa Suínos e Aves utilizando-se de protocolos de detecção molecular por qPCR detectou o gene do halotano, causador da hipertermia maligna em suínos. A detecção deste gene permite a seleção genética de animais reprodutores sem este gene, evitando que a cadeia de produção seja negativamente afetada e a qualidade final da carne suína seja prejudicada (18).

Vilas Boas et al. (19), avaliando a qualidade microbiológica por meio da qPCR de queijos minas Frescal artesanais e industrializados, detectaram a presença de *Salmonellla* spp. em 60% das amostras de queijos artesanais, mostrando-se impróprios para o consumo (19).

Froder, Gheno e Righi (20), com o auxílio da PCR em tempo real, identificaram 100% do DNA extraído de diferentes produtos cárneos processados termicamente de diferentes espécies animais e combinações de carnes descritas nos rótulos dos fabricantes.

Assim, é possível garantir a segurança do alimento aos consumidores alérgicos e evitar possíveis fraudes. A aplicação da qPCR é a maneira ideal de identificar alvos específicos de espécies devido à sensibilidade, confiabilidade, acurácia, conveniência, rapidez e menor risco de contaminação (20).

Biossensores

Nas últimas décadas, as tecnologias direcionadas aos biossensores têm apresentado avanços notáveis em diferentes áreas de aplicações, destacando-se a medicina, análise de alimentos, monitoramento ambiental e controle de processos em contextos industriais (21).

Diferentes áreas de aplicação do conhecimento têm como objetivo a busca pela detecção em tempo real, contínua e de baixo custo de analitos em diferentes ambientes. Técnicas convencionais (eletroforese capilar (CE), cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR)) exigem equipamentos centralizados, pessoal altamente qualificado para operação e alta quantidade de reagentes e materiais analíticos de alta qualidade, resultando em despesas operacionais substanciais (22).

Neste contexto, paralelo ao rápido avanço da bioeletrônica, especialmente em formas biointegradas, os biossensores surgiram como uma solução para melhorar significativamente a acessibilidade, eficiência e a relação custo-benefício na detecção contínua de analitos em uma ampla gama de aplicações e configurações (23).

Os biossensores são tipicamente constituídos por um biorreceptor, um transdutor e uma unidade de processamento de sinal. Seus elementos de reconhecimento geralmente abrangem receptores biométricos (enzimas, anticorpos e ácidos nucléicos), juntamente com componentes biomiméticos (nanomateriais inorgânicos e polímeros de impressão molecular (MIPs)). Desta forma, a transdução ocorre por meio de respostas eletroquímicas, óticas, sensibilidade à massa (sensores piezoelétricos) e termométricos (24).

A utilização dos biossensores ganha adeptos devido sua simplicidade durante o uso, exigindo a preparação mínima de amostras, apresenta resultados extremamente rápidos, determinando um único analito, ou seja, alta especificidade, sensibilidade, precisão e alta acurácia em um equipamento portátil. Além de apresentar baixo custo quando comparado às técnicas convencionais (25).

Diversos compostos e patógenos são detectados e monitorados em alimentos, conforme mostram as Tabelas 1 e 2.

Tabela 01 - Exemplos de analitos detectados em alimentos

ANALITOS	MATRIZ ALIMENTAR	BIOCOMPONENTE
Aminas	Peixe	Diamina oxidase (DAO)
Aminas	Frescor do peixe	Hipoxantina oxidase
Aminas biogênicas	Peixe	Diamina oxidase
Histaminas	Frutos do mar	Histamina oxiadase
Hipoxantina	Peixe e seu frescor	Xantina oxidase (XOD)
Bactéria	Aves	Anticorpo anti-*Salmonella*
Bactéria	Carne bovina	Anti-*Escherichia coli*
Bactéria, vírus e esporos	Hambúrguer e presunto	Anticorpo específico
Glicose	Leite	Glicose oxidase
	Iogurte	Galactosidase
Lactose	Leite	D-frutose desidrogenase

Lactulose	Leite	Galactosidase, lactozym e *Saccharomyces*
Biotina	Fórmula infantil e leite	Anticorpo anti-biotina
Folato	Fórmula infantil e leite	Anticorpo anti-biotina
L-Lisina	Leite	Liase oxidase
Antibióticos	Leite	Anticorpos
Colesterol	Creme de manteiga	Colesterol oxidase

Fonte: Meshram et al. (2018).

Tabela 02 - Exemplos de biossensores utilizados na detecção de microrganismos

Sistema de Transdução	**Elemento de Reconhecimento**	**Microrganismo**
Eletroquímico	Anticorpos	*S. typhimurium*
Eletroquímico	DNA	*Salmonella*
Eletroquímico	Anticorpos	*Salmonella*
Eletroquímico	DNA	*Legionella*
Eletroquímico	DNA	*Yersínia*
Impedométrico	Anticorpos	*Listeria*
Fibra Óptica	DNA	*E. Coli*
Bioluminescência	Anticorpos	*Candida albicans*

Fonte: Oliveira e Pereira (2016).

Biossensores baseados em anticorpos e receptores são utilizados na detecção de pesticidas, antibióticos (leite), solventes orgânicos, alfatoxinas, enterotoxinas estafilocócicas e os patógenos: *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* sv. *enteritidis*, *S. entérica* sv. *typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia pestis* (26, 27, 28).

Os biossensores essenciais para a implementação bem-sucedida de qualquer ponto crítico de controle de análise de risco (APPCC) devido à rapidez, baixo custo e serem portáteis (22, 25).

Microarrays - Microarranjos

A maioria das técnicas tradicionais de biologia molecular, geralmente, permite o estudo de um único gene ou um pequeno conjunto de genes. Entretanto, em *Microarrays* de expressão gênica é produzida uma "cópia instantânea" de toda a atividade transcricional de uma amostra biológica. Portanto, devido a grande geração de dados, modernas ferramentas computacionais e estatísticas são usadas para interpretá-los. Esta técnica possui uma ampla variedade de aplicações, incluindo descobrir novos subtipos de doenças, desenvolver novas ferramentas de diagnóstico e identificar mecanismos subjacentes de doença ou medicamento resposta.

Microarrays consistem em um grande número de sondas (clones de DNA, produtos de PCR ou oligonucleotídeos sintéticos) imobilizadas em uma superfície sólida. Após as etapas de hibridização e lavagem, o ácido nucleico ligado às sondas gera um padrão de fluorescência que é então registrado e analisado usando um scanner (29).

Em laboratórios clínicos, a *microarrays* é considerada uma técnica de diagnóstico rápido e confiável, devido à sua tecnologia pangenômica que é capaz revelar uma quantidade considerável de diferenças dentro do conteúdo genômico bacteriano, também permite a identificação de uma ampla gama de genes de micróbios patogênicos e não patogênicos ao mesmo tempo (30).

Com o rápido desenvolvimento da tecnologia *microarrays*, processou-se um acúmulo de dados inéditos que foram coletados por instituições acadêmicas e organizações industriais. Vários microarranjos foram desenvolvidos para patógenos associados aos alimentos. Um microarranjo específico, baseado no gene gyrB, foi usado para detectar e identificar rapidamente *Salmonella* e *Shigella* (31).

Ao inovar técnicas de detecção minimiza-se o percentual de infecções criando tecnologias para obter resultados precisos em aplicações que melhoram o gerenciamento e o controle de análises microbianas. A tecnologia de *microarrays* proporciona benefícios na detecção de patógenos em comparação com outras técnicas, devido ao seu nível de sensibilidade e especificidade em diferentes amostras, revelando uma análise microbiana complexa (38).

Testes de Fluxo Lateral (LFA)

Algumas limitações dos atuais métodos para detecção e identificação de patógenos (ELISA, PCR e qPCR) justificam a necessidade do desenvolvimento de uma abordagem mais rápida, específica, sensível, fácil de usar e acessível. Assim, surgem os testes imunocromatográficos de fluxo lateral conhecidos como testes rápidos de fluxo lateral ou apenas testes rápidos (33).

Esta técnica pode detectar rapidamente vários analitos (proteínas, haptenos, ácidos nucleicos, *amplicons* e microrganismos) de vários tipos de amostras, dentro de 5 a 30 minutos. Testes imunocromatográficos são compostos por filtro de amostra, suporte do conjugado, membrana de nitrocelulose e filtro de adsorção. As partes se sobrepõem uma sobre a outra e são montadas sobre uma placa de suporte (34).

O filtro de amostra possibilita a distribuição controlada e uniforme do material em análise para o suporte do conjugado, impedindo o alagamento do aparelho. Malhas de algodão, fibras de celulose e fibras de vidro são materiais, comumente, utilizados para este fim (35).

O suporte do conjugado é o resultado da junção de anticorpos ou antígenos com nanopartículas de ouro coloidal ou outras moléculas. Este deve ser fixado no suporte do conjugado, que tem como função transferir uniformemente a amostra sobre a membrana do teste (35). Dois métodos são tipicamente usados: o primeiro é a imersão do suporte de conjugado, o segundo é o uso de seringas que possibilitam dispensar com precisão por "spray" uma quantidade de microlitros por milímetro de material. Os materiais usados para o suporte são: fibras de vidro, poliéster e *rayons* (36).

A membrana de nitrocelulose é posicionada na área conhecida como região analítica, devendo conter reagentes de captura na linha teste e linha controle. Esta região pode ser constituída de outro tipo de material, como *nylon* e fluoreto de polivinilideno. A capilaridade da membrana de nitrocelulose é de extrema importância na produção de testes rápidos e pode influenciar na sensibilidade do teste. Estes incluem deposição de proteínas nas linhas teste e controle, através de dispensadores quantitativos, e posterior secagem a temperatura elevada e também processos de imersão para o bloqueio, com finalidade de evitar a ligações inespecíficas.

O Filtro de adsorção é o filtro absorvente, o qual é posicionado na extremidade distal da membrana de nitrocelulose e tem como finalidade puxar todo o fluido adicionado no teste assegurando que não ocorra a volta deste material, evitando assim falsos positivos. O material usado é tipicamente uma celulose de alta densidade (36).

Em relação a aplicação, os anticorpos são preferencialmente utilizados devido à sua alta especificidade na ligação aos analitos. Em um estudo conduzido por Lukman *et*

al. (37), um conjugado de AuNPs com anticorpos foi usado para a detecção de *S . Typhi* em amostras de água e leite, produzindo um limite de detecção (LOD) de 3×10^8 UFC.mL $^{-1}$. Hwang *et al*. em 2016 (38) usaram AuNPs e MNPs conjugados com anticorpos para detectar *Salmonella* em amostras de leite, relatando um LOD de 10^3 UFC.mL^{-1}.

Charlermroj *et al*., (39), desenvolveram uma abordagem para detectar bactérias vivas usando um LFA. Eles conjugaram AuNPs com bacteriófagos e empregaram tecnologia de *microarray* para produzir fragmentos de anticorpos específicos derivados de bacteriófagos anti-*Salmonella*. O teste apresentou especificidade para *Salmonella enteritidis*, sem mostrar reatividade a outras cepas.

Vantagens e Desvantagens

A identificação de patógenos e microrganismos indicadores em alimentos através de métodos moleculares tem sido bastante utilizada por apresentarem aspectos de qualidade e segurança nas análises de alimentos em toda a cadeia de produção. A Tabela 3 apresenta as principais vantagens e desvantagens das técnicas apresentadas anteriormente.

Tabela 03 – Comparação das vantagens e desvantagens de técnicas moleculares

Técnica molecular	Vantagens	Desvantagens
PCR simples	Mais rápido que os métodos baseados em cultura (4-24h vs. 5-7 dias); Alta especificidade e sensibilidade; PCR múltiplo: detecta vários patógenos ao mesmo tempo; Automatizado; Resultados precisos e exatos a partir da detecção genética específica; Diferenciação de vários sorotipos de microrganismos. Exemplo: *Salmonella* 5-6 podem ser detectadas em uma única reação.	Necessidade de equipamentos caros e profissionais treinados Dificuldade em distinguir entre células vivas e mortas. · Tecnicamente pode ser um desafio otimizar as condições de PCR. · O enriquecimento é necessário para detectar células visíveis. · Necessita de processamento pós-PCR dos produtos (eletroforese).
PCR em tempo real	É mais específico e sensível do que os métodos baseados em cultivo. Não é influenciado por amplificação inespecífica. A amplificação pode ser monitorada em tempo real. Confirmação de amplificação específica através de curvas de fusão.	Dificuldade em múltiplos ensaios. Atividade do RNAm. Possibilidade de contaminação cruzada
Biossensores	Alta sensibilidade e seletividade. Automatizáveis e miniaturizáveis. Reprodutibilidade Rapidez na análise e execução tempo real. Análise múltipla de patógenos em alimentos perecíveis e semi-perecíveis. Permite a existência de diversas configurações para uma diversidade de propriedades transdutoras Vida útil longa dos dispositivos (matérias estáveis e resistentes) Na maioria dos casos é desnecessário o tratamento das amostras	Certos biossensores podem exigir extensos pré-tratamentos das amostras. Existem poucas plataformas de biossensores individuais disponíveis comercialmente.

***Microarrays* (Microarranjos)**	Mais rápido que os métodos baseados em cultura (2-4 h e 5-7 dias). · Análise múltipla (até 100 esferas diferentes disponíveis). · Alta sensibilidade e especificidade, podendo caracterizar as cepas Trabalho eficaz (9600 amostras podem ser testadas). · Se um alvo adicional precisar ser incluído no teste, ele poderá Dever ser incluído um branco um branco na análise, um novo tipo de pérola vinculada pode ser facilmente adicionado à sonda.	Dificuldade em distinguir entre células vivas e mortas. Requer kits ou PCR para marcação do gene branco.
Testes de Fluxo Lateral (LFA)	Abordagem mais rápida, específica, sensível, fácil de usar e acessível. Podem ser aplicados no ambiente clínico, rural e indústrias de alimentos. Facilidade de uso e custo de fabricação barato. Longa vida útil e sem necessidade pessoal especializado Não requerem pré-preparação para amostras de fluidos ou etapas de lavagem.	Baixa sensibilidade e especificidade para alguns patógenos

Portanto, deve se avaliar as necessidades de cada indústria alimentícia ou pesquisa, avaliando a matriz alimentar e suas aplicações, para decidir qual metodologia será aplicada, levando em conta as vantagens e desvantagens da aplicação de cada tipo de testagem de acordo com as condições necessárias para cada metodologia.

Aplicações

A detecção de patógenos em matrizes alimentares com alta reprodutibilidade e sensibilidade são de extrema importância para garantir a segurança dos alimentos. No entanto, ainda é um desafio difícil devido a fatores como a interferência de outras microbiotas e da microbiota não-alvo, o baixo número de grupos-alvo e as dificuldades na extração microbiana de matrizes alimentares.

As técnicas de PCR e PCR em tempo real são usadas para detectar com sucesso patógenos bacterianos importantes, como *Salmonella* spp, *Campylobacter* sp., *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *V. parahaemolyticus* em diversos alimentos (9,40,41,42,43). Esses grupos bacterianos são os principais agentes causadores de DTAs, por crescimento bacteriano direto e/ou secreção de toxinas.

Dentre os biossensores utilizados para detecção de patógenos e compostos em alimentos, as técnicas baseadas em DNA possibilitam a detecção de *B. anthracis*, *E. coli* e *L. monocytogenes*, além da detecção de Aflatoxinas, PCB e pesticidas. Já os métodos baseados em enzimas permitem a detecção de pesticidas, antibióticos (leite), ácido benzóico (refrigerante), L-lactase (extrato de tomate), e aminas, bem como a presença de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella enterica sv. Typhimurium* (21, 42).

Utilizando microarrays, um microarranjo específico, baseado no gene gyrB, foi detectada e identificada rapidamente para *Salmonella* e *Shigella* (31).

Através dos Testes de Fluxo Lateral (LFA) podem-se detectar rapidamente vários analitos dentro um curto tempo, de 5 a 30 minutos (34). Hwang *et al*. em 2016 (38) usaram AuNPs e MNPs conjugados com anticorpos para detectar Salmonella em amostras de leite, relatando um LOD de 10^3 UFC.mL^{-1}.

CONCLUSÕES

As atuais técnicas moleculares (PCR, qPCR, biosensores, microarrays e LFA) contribuem com maior eficácia, seletividade e especificidade às análises microbiológicas e são empregadas em diferentes setores da economia e pesquisa, gerando resultados mais rápidos e menos onerosos, tornando-as alternativas viáveis para detecção de compostos e microrganismos.

Essas abordagens são extremamente úteis na tomada de decisão no setor de alimentos, pois são usadas na pesquisa e na indústria para a detecção de compostos e patógenos em alimentos, bem como no gerenciamento de surtos transmitidos por alimentos, desempenhando um importante papel na garantia do controle de qualidade e a saúde pública.

Mesmo as análises modernas fornecendo resultados efetivos, os métodos tradicionais continuarão sendo utilizados, pelos mais diversos motivos que atendem a demanda de parte dos usuários.

Além disso, mais pesquisas devem ser realizadas sobre o desenvolvimento de abordagens mais eficazes para o controle e eliminação de patógenos transmitidos por alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). OPAPANAFTOSA alerta que doenças transmitidas por alimentos podem ser evitadas com ações preventivas do campo à mesa. 2022. Disponível em: https://www.paho.org/pt/noticias/7-6-2022-panaftosa-alerta-que-doencas-transmitidas-por-alimentos-podem-ser-evitadas-com. Acesso em: Jul. 2024.

2. Araujo LP de, Ferreira LP, Freitas MFU, Nunes C dos R. Análise microbiologica de alimentos minimamente processados comercializados. R. Interdisc. Pens. Cient., 2020; *6*(1):187-262.

3. Lemos, L. M. D. R. Prospecção científica e levantamento do conhecimento acadêmico sobre métodos moleculares para detecção de patógenos em alimentos. [Tese]. Santa Catarina. Programa de pós-graduação em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2024. 154 p.

4. Adams G; A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *Biochem.* 2020; 42 (3): 48–53.

5. Kesmen Z, Büyükkiraz ME, Kahraman N, Yetim H. Detection of Fraudulent Practices Involving Some Plant Derived Compounds In Foods Using Real-Time PCR. The J. of Food, 2017; 42(3): 305-314.

6. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. Sensors (Basel). 2018; 18(4):1271.

7. Jayaweera TSP, Ruwandeepika HAD, Deekshit VK, Vidanarachchi JK, Kodithuwakku SP, Karunasagar *et al.* Prevalence of Salmonella Pathogenisity

Island (SPI1, SPI2, SPI3 and SPI5) Genes in Salmonella species Isolated from fresh Broiler Chicken Meat in Sri Lanka. The J. of Agric Scienc. 2021; 16(2): 333-351.

8. Lee N, Kwon KY, Oh SK, Chang HJ, Chun HS, Choi SW. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, Bacillus cereus, Vibrio parahaemolyticus, Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and Staphylococcus aureus in Korean ready-to-eat food. Foodborne Pathog Dis. 2014;11(7):574-80.

9. Moezi, P.; Kargar, M.; Doosti, A.; Khoshneviszadeh, M. Multiplex touchdown PCR assay to enhance specificity and sensitivity for concurrent detection of four foodborne pathogens in raw milk. *J. Appl. Microbiol.* 2019;127(1):262-273.

10. Aladhadh M. A Review of Modern Methods for the Detection of Foodborne Pathogens. *Microorganisms*. 2023; 11(5):1111.

11. Arguello YMS. Detecção de fatores de virulência e resistência antimicrobiana em estirpes de Compylobacter ssp. em isolados humanos e de matadouros-frigoríficos de aves na região sul do Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de veterinária. Programa de pós-graduação em ciências veterinárias. Porto Alegre. 2015.

12. SOUZA PBA. Avaliação de *Listeria monocytogenes* em melão e jabuticaba, Viçosa, 2014. Tese (mestrado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.
13. Soni DK, Singh M, Singh DV, Dubey SK. Virulence and genotypic characterization of Listeria monocytogenes isolated from vegetable and soil samples. BMC Microbiol. 2014; 14: 241.

14. EL-SHARKAWY H, TAHOUN A, EL-GOHARY AEA, EL-ABASY M, EL-KHAYAT F, GILLESPIE T et al. Epidemiological, molecular characterization and antibiotic resistance of Salmonella entérica serovars isolated from chicken farms in Egypt. Gut Pathogens, 2017; 9(1): 1-8.

15. SIALA M, BARBANA A, SMAOUI S, HACHICHA S, MAROUANE C, KAMMOUN S et al. Screening and detecting salmonella in different food matrices in southern Tunisia using a combined enrichment/ real-time PCR method: correlation with conventional culture method. Frontiers in Microbiology, 2017; 8(1): 1-10.

16. Artuvan, E, Aksay S. In food safety control overview of using Real-Time PCR. Biotech Studies. 2022; 31(2): 53-60.

17. RODRÍGUEZ-LÁZARO D, COOK N, HERNÁNDEZ M, Real-time PCR in Food Science: PCR diagnostics. Cur. Issues in Molec Biol, 2013; 15(2): 39-44.

18. EMBRAPA. Otimização de protocolos de detecção molecular por PCR e qPCR para diagnóstico do gene do halotano em suínos. ISSN 0102-3713 CIRCULAR TÉCNICA 63 Concórdia, SC Dezembro, 2022.

19. Villas BAF, Belpiede ELS, da Silva NRF, da Silva MF, Veiga SMOM Microbiological quality assessment of house made and industrialized Minas Frescal cheese. Braz. J. of Develop 2020; 6(10):83536-83552.

20. Fröder H, Gheno BP, Righi E. Validation and standardization of real-time pcr for animal species identification in processed foods. Rev Foco|. 2024;17(4):01-23.

21. Meshram, Bhushan & Agrawal, Ashok & Adil, Shaikh & Ranvir, s.G & Sande, K.K.. (2018). Biosensor and its Application in Food and Dairy Industry: A Review. Intern J. of Curr Microbiol and App Scienc. 2018; 7(2):3305-3324.

22. Ali AA, Altemimi AB, Alhelfi N, Ibrahim SA. Application of Biosensors for Detection of Pathogenic Food Bacteria: A Review. Biosensors. 2020; 10(6):58.

23. Farooq U, Yang Q, Ullah MW, Wang S. Bacterial biosensing: Recent advances in phage-based bioassays and biosensors. Biosen & Bioelectr. 2018 118(1):204-216.

24. Oliveira, A E F; Pereira, A C Biossensores e a Indústria Alimentar – Revisão. Rev. Virtual Quim, 2016; 8(5): 1-23.

25. Suherman S, Janitra A, Budhiary K, Pratiwi Wahyu, Idris, F. (2021). Review on hazard analysis and critical control point (HACCP) in the dairy product: Cheese. IOP Conference Series: Mat Scienc and Engine 1053. 012081. 10.1088/1757-899X/1053/1/012081.

26. Lim AS, Ahmed UM. CHAPTER 1: Introduction to Immunosensors in Immunosensors, ed Ahmed MU, Zourob M, Tamiya E, The Royal Society of Chemistry, 2019, pp. 1-20.

27. Hadjilouka A, Loizou K, Apostolou T, Dougiakis L, Inglezakis A, Tsaltas D. A Cell-Based Biosensor System for *Listeria monocytogenes* Detection in Food. *Proceedings*. 2020; 60(1):49.

28. Zhao X, Lin C-W, Wang J, Oh DH Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. J Microbiol Biotechnol , 2014; 24(3):297–312.

29. Chen G, Yang L, Liu G., Zhu Y, Yang F, Dong, X et al. Research progress in protein microarrays: Focussing on cancer research. *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 2023; *17*(1).

30. Montaño, LEC., Sánchez, VHR., Vargas, ALT., Cruz, KDR., Hinostroza, GSA., Meneses, LAC *et al*. Identificación de parásitos patógenos (*Yersinia pestis* y *Bacillus anthracis*) en alimentos, utilizando microarrays de adn como herramienta de análisis microbiano. Redieluz. 2022; 12 (1), 106 – 114.

31. Adetunji, CO, Palnam, WD, Ayeni, AE, Akram, M, Michael, OS, Siddique, A *et al*. Molecular Characterization of Foodborne Pathogens. Apple Academic Press; 2023. 157p.

32. Wang M, Zhang Y, Tian F, Liu X, Du S, Ren G. Overview of rapid detection methods for Salmonella in foods: Progress and challenges. Food. 2021;10(10):2402.

33. WERSOM ESS, MOTTA LR, BAZZO ML, FRANCHINI M, JUNIOR OCF. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Brasília: Ministério da Saúde. 56p, 2013.

34. SHAN S, LAI W, XIONG Y, WEI H, XU H. Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens. J. of Agric. and Food Chemist. 2015; 63(3), 745-753.

35. MILLIPORE. Rapid Lateral Flow Test Strips, Considerations for product development. Darmstadt; 2013, 36p.

36. SAJID M, KAWDE NA, DAUD M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: a literature review. Journal of Saudi Chemical Society. 2015; 19(6), 689-705.

37. Lukman, YM, Dyana ZN, Rahmah N, Khairunisak AR. Development and Evaluation of Colloidal Gold Lateral Flow Immunoassays for Detection of Escherichia coli O157 and Salmonella Typhi. J. Phys. Conf. Ser. 2018, 1082, 012049.

38. Hwang J, Kwon D, Lee S, Jeon S. Detection of Salmonella bacteria in milk using gold-coated magnetic nanoparticle clusters and lateral flow filters. J. RSC Adv. 2016; 6(1):48445–48448.

39. Charlermroj R, Makornwattana M, Phuengwas S, Karoonuthaisiri N. A rapid colorimetric lateral flow test strip for detection of live Salmonella enteritidis using whole phage as a specific binder. Front. Microbiol. 2022, 13, 1008817.

40. Carvalho RN, Oliveira NA, Mesquita AJ, Minafra e Rezende CS, Mesquita AQ, Romero RAM. Identificação por PCR e ELISA (VIDAS ECO O157®) de Escherichia coli O157:H7 em queijo Minas Frescal comercializado em Goiânia, GO. Braz. J. Microbiol. 45 (1). 2014

41. Samad A, Abbas F, Ahmad Z, Tanveer Z, Ahmad I, Patching SG, Nawaz N.; Asmat, M.T.; Raziq, A.; Naeem, M. Multiplex polymerase chain reaction detection of Shiga toxin genes and antibiotic sensitivity of Escherichia coli O157: H7 isolated from beef meat in Quetta, Pakistan. J. Food Saf. **2018**; *38(1): 1-8.* e12540.

42. Vinayaka AC, Ngo TA, Kant K, Engelsmann P, Dave VP, Shahbazi M *et al*. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with

combination of sample concentration and direct PCR. Biosens. Bioelectron. **2019**; *129*, 224–230.

43. Pires NM, Dong T, Yang Z, da Silva LF. Recent methods and biosensors for foodborne pathogen detection in fish: Progress and future prospects to sustainable aquaculture systems. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **2021**; *61(11):*1852–1876.

44. El-Sayed, AS, Ibrahim, H & Farag, MA. Detection of Potential Microbial Contaminants and Their Toxins in Fermented Dairy Products: a Comprehensive Review. Food Anal. Methods. 2022; 15(18), 1880–1898.

Conbraca

Fortaleza

Congresso Brasileiro de Ciência dos alimentos

DESENVOLVIMENTO E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL, VEGETAL E/OU BEBIDAS

III CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Use Ctrl+F para pesquisar e acessar os trabalhos apresentados no evento!