







ESTUDO DA DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. EM ALIMENTOS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE FORTALEZA-CE ATRAVÉS DE MÉTODO MOLECULAR (qPCR) E MÉTODO CONVENCIONAL

STUDY OF DETECTION OF SALMONELLA SPP. IN FOOD SOLD IN THE CITY OF FORTALEZA-CE THROUGH MOLECULAR METHOD (qPCR) AND CONVENTIONAL METHOD

FRANCISCA RAQUEL VIEIRA DE ARAÚJO¹  CÍCERA NAYARA ALEXANDRE DE OLIVEIRA² 
SÔNIA COELHO ABREU DE OLIVEIRA³  TÍCIANE COELHO ABREU DE OLIVEIRA⁴ 
CYNTHIA LADYANE ALVES DE MOURA⁵  MAYRA GARCIA MAIA COSTA^{*6} 

¹Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará – NUTEC, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Especialista em Vigilância Sanitária de Alimentos. Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará – NUTEC, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³Especialista em Ciência de Alimentos. Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará – NUTEC, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁴Mestre em Ciência de Alimentos. Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará – NUTEC, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁵Doutora em Biotecnologia. Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará – NUTEC, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁶Doutora em Tecnologia de Alimentos. Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará – NUTEC, Fortaleza, Ceará, Brasil.

*Autor Correspondente: mayragarciamai@gmail.com

RESUMO

A Salmonelose é uma das doenças mais comuns no mundo, transmitida por alimentos contaminados com diversos sorotipos de *Salmonella* spp., que ameaçam a segurança alimentar e a saúde pública. Em muitos países as sorovares Enteritidis e Typhimurium são as mais comuns, encontradas principalmente em ovos, frangos e carne bovina. Os alimentos podem ser contaminados com esse microrganismo ao longo de toda a cadeia produtiva, durante as etapas de manuseio, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização. Atualmente, existem diversas metodologias para detecção de *Salmonella* spp., incluindo o isolamento convencional, testes rápidos e as metodologias moleculares rápidas. O método de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR) ou PCR em tempo real trata-se de uma ferramenta promissora em estudos que visam quantificar populações de microrganismos associadas a alimentos e apresenta a vantagem de detectar microrganismos mesmo em pequenas concentrações na amostra. Nesta pesquisa, 182 amostras de alimentos de origem animal e vegetal, comercializadas na cidade de Fortaleza - Ce, foram submetidas a análise de detecção de *Salmonella* spp. visando avaliar duas metodologias diferentes empregadas na detecção desse microrganismo (técnica de isolamento convencional - ISO 6579 e o PCR em tempo real - Plataforma Gene UP). Das amostras analisadas, foram detectadas *Salmonella* spp. em 38 amostras utilizando o PCR em tempo real (Gene up) e em 22 amostras utilizando a técnica de isolamento convencional - ISO 6579, representando percentuais de detecção de 20% e 12%, respectivamente. A diferença de 8% de positividade entre os métodos se justifica pela técnica de qPCR ser um método que detecta em nível molecular o DNA microbiano, apresentando alta sensibilidade, especificidade, precisão e rapidez. Enquanto o teste tradicional de isolamento convencional detecta o microrganismo em níveis cultiváveis, ou seja, aquele que está apto ao desenvolvimento no alimento. Foi constatado que o método molecular utilizado é uma ferramenta promissora para o diagnóstico de patógenos em alimentos e pode otimizar o tempo de respostas dos ensaios nos laboratórios.

Palavras-chave: *Salmonella* spp.; qPCR; métodos moleculares para alimentos.

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most common diseases in the world, transmitted by food contaminated with different serotypes of *Salmonella* spp., which threaten food safety and public health. In many countries the Enteritidis and Typhimurium sovars are the most common, occurring mainly in eggs, chicken and meat. Food can be contaminated with this microorganism throughout the entire production chain, during the transport, processing, storage, distribution and distribution stages. Currently, there are several methodologies for detecting *Salmonella* spp., including conventional isolation, rapid tests and rapid molecular methodologies. The quantitative polymerase chain reaction (qPCR) or real-time PCR method is a promising tool in studies that aim to quantify the population of microorganisms associated with food and has the advantage of detecting microorganisms even in small concentrations in the sample. In this research, 182 food samples of animal and vegetable origin, sold in the city of Fortaleza-CE, were subjected to an analysis to detect *Salmonella* spp. compare two different methodologies used to detect these microorganisms (conventional isolation technique - ISO 6579 and real-time PCR (Gene UP Platform). Of the samples tested, *Salmonella* spp. were detected in 38 samples using real-time PCR (Gene up) and in 22 samples using the conventional isolation technique - ISO 6579, representing detection percentages of 20% and 12%, respectively. The difference of 8% positivity between the methods is justified by the qPCR technique being a method that detects in molecular level of microbial DNA, presenting high sensitivity, specificity, precision and speed. While the traditional conventional isolation test detects the microorganism at cultivable levels, that is, one that is capable of developing in food. It was found that the molecular method used is a promising tool for diagnosing pathogens in food and can optimize assay response times in laboratories.

Key words: *Salmonella* spp.; qPCR; food molecular methods.

Citar este artigo como:

Araújo, F.R.V.; Oliveira, C.N.A.; Oliveira, S.C.A.; Oliveira, T.C.A.; Moura, C.L.A.; Costa, M.G.M. Estudo da detecção de *Salmonella* spp. em alimentos comercializados na cidade de Fortaleza - CE através do método molecular (qPCR) e método convencional. *Nutrivisa*.v.11:e12097.2024. Doi: <https://doi.org/10.17648/nutrivisa-2024v11e12262>

INTRODUÇÃO

A salmonelose, uma doença causada por *Salmonella* spp. é uma das infecções de origem alimentar mais comumente relatadas em todo o mundo. Anualmente, são notificados aproximadamente 197 milhões de casos de salmonelose e aproximadamente 84.000 mortes em todo o mundo. No Brasil, a estimativa é que a *Salmonella* spp. foi o gênero mais identificado em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) entre 2009 e 2021, com aproximadamente 39.314 casos e 34 mortes (GBD, 2018, MARQUES E TRINDADE, 2022). Os alimentos comumente contaminados por *Salmonella* incluem produtos derivados de ovos, laticínios, produtos cárneos, e produtos derivados de peixe. As espécies de *Salmonella* são tolerantes ao sal e resistentes a baixas temperaturas e podem sobreviver por 2 meses a 4°C. Em ambientes aquáticos e do solo, a *Salmonella* pode sobreviver por vários meses ou até anos enquanto espera por uma chance de entrar em um novo anfitrião (LIU et al., 2022).

As *Salmonellas* são bactérias gram-negativas, não capsuladas, em forma de bacilos, anaeróbias facultativas pertencentes à família Enterobacteriaceae. Além disso, englobam gêneros heterogêneos que causam diferentes quadros de infecções e intoxicações, porém em humanos duas espécies são as principais responsáveis: *S. enterica* e *S. bongori*. No entanto, todas as espécies podem ser suscetíveis à salmonelose sob determinadas condições, uma vez que os soares de *Salmonella* spp. podem causar a doença em vários hospedeiros (FURQUIM et al., 2021).

Devido à prevalência de espécies de *Salmonella* e aos riscos para a saúde associados à bactéria, é crucial a evolução de métodos de detecção deste microrganismo. As técnicas moleculares para detecção de contaminantes em alimentos apresentaram grande avanço nos últimos anos, com a possibilidade de identificar bactérias e fungos através de métodos independentes de cultivo. A avaliação da diversidade microbiológica em alimentos é dificultada diante da necessidade de se estabelecer condições necessárias para a multiplicação bacteriana, requerimento de condições estritamente anaeróbicas para algumas espécies, além de dificuldades relacionadas a condições de interações entre as bactérias e outros microrganismos. Tais limitações motivam o emprego de métodos independentes de cultivo para o estudo da atividade e estrutura microbiana

em ambientes complexos (GIRAFFA E CARMINATI, 2008, VILARREAL et al., 2013).

A maioria dos métodos para monitoramento e identificação de bactérias em ambiente complexo se baseiam na análise da sequência da subunidade 16S do operon do RNA ribossômico (16S rRNA). Durante as últimas décadas, esse método tem revolucionado a maneira como taxonomistas identificam e classificam as bactérias, já que este compreende regiões altamente conservadas do gene, bem como outras regiões suficientemente variáveis, para a diferenciação entre espécies. Bancos de dados dispõem mais de milhões de sequências de genes, atualizados mensalmente para utilização do 16S rRNA (VAUGHAN et al., 2005; JUSTÉ et al., 2008; PADILHA, 2013).

Outro método tem sido desenvolvido para detecção e quantificação de bactérias: o método de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR) ou PCR em tempo real. Trata-se de uma ferramenta promissora em estudos que visam quantificar populações de microrganismos associadas a alimentos e apresenta a vantagem de quantificar microrganismos mesmo quando em pequenas proporções na amostra. Tem sido amplamente aplicado para a enumeração de bactérias e fungos em alimentos fermentados, como leite fermentado e vinhos e mais recentemente explorado para microrganismos contaminantes de interesse em segurança de alimentos (GIRAFFA E CARMINATI, 2008; JOHNSON et al., 2021).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de ampliação rápida de segmentos específicos, possui como principal característica a capacidade de produção exponencial de pequenas quantidades de material genético em horas. Esta técnica foi desenvolvida em 1983 e descrita em 1990 por Kary Mullis (BARE et al., 2004).

A PCR é realizada em três principais etapas, são elas: desnaturação, hibridização e extensão. Estas três principais etapas são realizadas em ciclos, sendo repetidos em média de 30 a 40 vezes. Na desnaturação acontece à quebra de pontes de hidrogênio nas bases nitrogenadas, esta etapa geralmente ocorre entre 92°C e 95°C. Já a hibridização (ligação com o iniciador) pode variar de acordo com a sequência do oligonucleotídeo utilizado, nessa fase que ocorre o anelamento entre o iniciador e a molécula de DNA alvo. Esta variação de temperatura depende da sequência do iniciador. Por

fim a fase de extensão na qual as ligações mais estáveis permitem que o DNA polimerase sintetize uma fita complementar de DNA (GONÇALVES, 2012).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência de *Salmonella* spp. em alimentos comercializados na cidade de Fortaleza, por meio de técnicas de qPCR e técnica clássica dependente de cultivos empregados na detecção deste patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem de alimentos

Durante o período de abril a outubro de 2023, foram avaliadas 182 amostras de alimentos de origem animal e vegetal, provenientes de redes de supermercados do município de Fortaleza – CE. Após a coleta, as amostras foram assepticamente acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e transportadas, imediatamente, para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará para o início das análises.

Técnica de qPCR

No laboratório foram pesadas 25 g de cada amostra, em condições de assepsia, em sacos de 400 mL com filtro (TEMPO®, bioMerieux® AS) e homogeneizadas com 225mL de água peptonada tamponada em Stomacher incubadas em estufas bacteriológicas a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18-26 horas, para a etapa de pré-enriquecimento. Posteriormente foi realizada a etapa de Lise através do GENE-UP® Lysis Kit 3, com uma micropipeta e uma ponteira com filtro foi inoculado 20 μL de amostra para o tubo de lise, em capela de fluxo laminar estéril. Em seguida, as amostras de tubos de lise tampadas, foram levadas a homogeneização em Vortex Troememner, por cinco minutos a 2200 rpm. Para a etapa de PCR, em uma capela com fluxo laminar estéril e utilizando uma micropipeta e ponteiras com filtro, foram transferidos 10 μL dos tubos lises, correspondente a cada amostra respectiva para GENE-UP® Salmonella 2 (SLM2). Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de centrifugação por 10 segundos a 1000 rpm. Usando o mapa de placas criado no software GENE-UP® Routine para determinar o número de tubos de PCR necessários de o kit GENE-UP® PCR, para ser utilizados no termociclador GENE-UP®. Em seguida foi feito o cadastro do microrganismo e lotes dos kits Lisy e SLM 2, no

software, dando-se início a corrida das amostras, com duração de 50 minutos.

Metodologia convencional

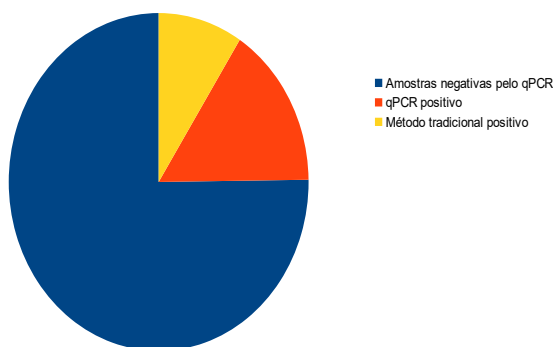
No laboratório foram pesadas 25 g de cada amostra, em condições de assepsia, em sacos de 400 mL estéreis e homogeneizadas com 225mL de água peptonada tamponada em Stomacher incubadas em estufas bacteriológicas a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 horas, para a etapa de pré-enriquecimento. Posteriormente foi realizado o enriquecimento seletivo com alíquotas de 0,1 mL das amostras pré incubadas em caldo Rappaport Vassiliadis e Selenito Cistina, respectivamente incubados a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24h. Alíquotas de 1 mL as amostras pré incubadas foram adicionados em caldo Muller Kauffman Tetratoato, previamente enriquecido com iodo-iodeto, novabiocina e verde brilhante, incubado a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24h. A seguir, alíquotas do inóculo de cada tubo, foram semeadas em placas contendo meios seletivos ágar Xilose Lisina Desoxicolato e ágar Sulfito Bismuto, incubados a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Para a confirmação bioquímica e sorológica, foram estriadas colônias positivas em superfície das placas de ágar de nutrientes de forma a permitir o desenvolvimento de colônias bem isoladas, incubadas em estufa bacteriológica $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Para a confirmação bioquímica são inoculadas através de picada profunda e estrias na superfície inclinada de ágar ferro com açúcar triplo e ágar Uréia, respectivamente e inoculada em caldo L-Lisina, ambos incubados em estufa bacteriológica $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Para a identificação sorológica, utilizou-se anti-soro polivalente O e H, em placas de petri estéreis, promovendo um esfregaço, provenientes da cultura de ágar nutriente, já pré- incubado e uma gota de cada soro separadamente, promovendo aglutinações, em caso positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de análise molecular de patógenos em alimentos pelo equipamento do GENE-UP® PCR é um método de triagem, por se tratar de uma técnica sensível que detecta o gene de microrganismos, sendo o teste negativo confirmatório e o positivo passível de ser validado pela técnica clássica, uma vez que muitas vezes o gene do microrganismos pode estar presente, porém não cultivável, desta forma os alimentos pesquisados foram submetido inicialmente pela técnica molecular,

e os casos positivos seguiram para confirmação pelo método tradicional. Das 182 amostras de alimentos analisadas, 144 apresentaram ausência de *Salmonella* spp. e 38 presença pela técnica de qPCR (Gene Up), conforme figura 1. As amostras que apresentaram presença pela técnica molecular, foram submetidas a análise por técnica de isolamento convencional - ISO 6579 e destas 22 confirmaram crescimento. A tabela 1 traz a relação entre número de amostras analisadas para *Salmonella* spp. durante o período de abril a outubro de 2023. Das 38 amostras analisadas que confirmaram presença pela técnica de qPCR, apenas uma delas era de origem vegetal, sendo que esta ao passar para confirmação em meio de cultura não apresentou crescimento, sendo a totalidade das amostras positivas por método tradicional de origem animal e que não passaram por métodos de conservação, como aquecimento, acidificação ou cura, por exemplo.

Figura 1 – Total de amostras negativas para *Salmonella* spp. pelo método de qPCR e positivas para *Salmonella* spp. pelo método de qPCR e método tradicional



A avaliação dos dois métodos, molecular e tradicional, demonstrou percentuais de detecção de 20% e 12%, respectivamente. A diferença de 8% de positividade entre os métodos se justifica pela técnica de qPCR ser um método que detecta em nível molecular o DNA microbiano, apresentando alta sensibilidade, especificidade e precisão. Enquanto o teste tradicional de isolamento convencional - ISO 6579 detecta o microrganismo em níveis cultiváveis, ou seja, aquele que está apto ao desenvolvimento no alimento e representa um risco potencial a qualidade do produto final, sendo um método confirmatório para níveis de segurança de alimentos. Em casos confirmatórios de *Salmonella* spp. nas amostras pela técnica de qPCR é necessário utilizar o isolamento convencional para confirmação

Tabela 1 – Relação entre número de amostras analisadas para *Salmonella* spp. durante o período de abril a outubro de 2023.

Amostras	Amostras analisadas	Positivas pelo método qPCR (Gene Up)	Positivas pelo método tradicional (ISO 6975)
Origem animal	156	37	22
Origem vegetal	26	1	0

dos resultados, pois as propriedades fenotípicas das bactérias podem não ser expressas ou serem difíceis de serem observadas, e também existe a possibilidade de haver células viáveis e não-cultiváveis. Mesmo que o método molecular empregado não possua caráter confirmatório em casos de positividade, ainda sim a aplicação destas técnicas são justificadas pela triagem realizada, uma vez que só será necessário confirmar pelo método tradicional, aquelas amostras que apresentarem resultados positivos, economizando tempo de ensaio, tempo de permanência nos equipamentos, insumos e tempo do analista. No caso deste trabalho, das 182 amostras analisadas pela técnica molecular, 144 delas apresentaram resultados negativos para o parâmetro pesquisado em 24 h, apenas as amostras que apresentaram resultados positivos no método molecular foram submetidas ao método tradicional confirmatório, método este que leva em média, 5 dias para conclusão do resultado. Reforçamos que a técnica molecular empregada nesta pesquisa é oficial validada pela AOAC International (JOHNSON et al., 2021), requisito necessário pela legislação de Parâmetros Microbiológicos de Alimentos RDC No 724 de 2022 (BRASIL, 2022).

Recentemente foram notificados casos de Salmonelose associados ao consumo de chocolate de uma grande marca internacional, as notificações chegaram a pelo menos 11 países. No dia 27 de março de 2022, a OMS foi informada pelo Reino Unido de um conjunto de casos de *Salmonella* Typhimurium de origem desconhecida. Testes rápidos confirmaram a presença da bactéria. O sequenciamento das amostras e evidências epidemiológicas ligaram o surto a produtos de chocolate da Bélgica que, até o dia 25 de abril de 2022, foram distribuídos para pelo menos 113 países (ONU NEWS, 2022). A rápida identificação nestes

alimentos, este investimento se torna imprescindível para maior desenvolvimento e amplitude de informações que se pode chegar através dessas ferramentas. Dados de Segurança de Alimentos também podem ser reforçados por meio de técnicas moleculares, para a rápida detecção de microrganismos em alimentos, e isto se torna essencial para a tomada de medidas, como documentos técnicos, reforço das políticas de controle entre outras atividades.

CONCLUSÕES

Através da adoção da técnica de qPCR otimizou-se tempo de resposta de ensaio de 144 amostras de alimentos, as quais o resultado se deu em 24 h, nos casos negativos. O comparativo de 38 amostras positivas pela técnica molecular que seguiram para confirmação pelo método clássico, demonstrou diferença de 8% positividade. Destaca-se o qPCR como método rápido eficiente para detectar a prevalência de *Salmonella* spp em alimentos, com as seguintes vantagens: redução das etapas de ensaio, dos meios de cultura, insumos empregados e amplitude de informações das amostras analisadas.

REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISO 6579. Microbiologia de Alimentos e alimentação de animais: método horizontal para a detecção de *Salmonella* spp. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

BARE, J.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev. bras. hematol. hemoter.* São Paulo, v. 4, n. 26, p.274-281, ou/dez. 2004.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução - RDC N° 724, de 1° de julho de 2022. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis>. Acessado em: 13 de dezembro 2023.

DIAS, J. Referências para controle de *Salmonella* em alimentos de baixa atividade de água. Campinas: Food Safety Brazil, 2023. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/referencias-para-controle-de-salmonella-em-alimentos-de-baixa-atividade-de-agua/>. Acesso em 08 de dez 2023.

FURQUIM, I.R.V.; CAMPOS, B.F.; SITTA, M.J.Z.; PLAZA, M.A.S.; SPAZIANI, A.O. Óbitos por

Salmonella no período compreendido entre 2013 e 2017 de acordo com dados disponíveis no Datasus. *Braz J Dev.* v. 7, p.48323-48332, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n5-302 . Acesso em 20 out. 2023.

GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and etiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis*, New York, v.18, n11, p. 1211-1228, nov. 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30362-1. Acesso em: 20 nov. 2023.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D. Molecular techniques in food fermentation: principles and applications. In: COCOLIN, L.; ERCOLINI, D. Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods. Food microbiology and food safety series. New York: Editora Springer, 2008. cap.1, p.1- 30.

GONÇALVES, A. Diagnóstico molecular para detecção de patógenos alimentares em embutidos. 2012. Trabalho de conclusão de curso (GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa.

JOHNSON, R.L.; MILLS, J.C; TAYLOR, N. J.; BIRD, P.M. Evaluation of the GENE-UP *Salmonella* Method for the Detection of *Salmonella* Species in a Broad Range of Foods and Select Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2020.02. *J AOAC INT*, v. 104, p.1084-1097, 2021. DOI: 10.1093/jaoacint/qsab005. Acesso em 10 set 2023.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B.P.H.J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, v.25, p.745-761, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.009>. Acesso em 23 out 2023.

LIU, L.; ZHAO, G.; LI, X.; XU, Z.; LEI, H.; SHEN, X. Development of rapid and easy detection of *Salmonella* in food matrices using RPA-CRISPR/Cas12a method. *LWT – Food Sci and Technol*, v.162, p. 1-8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113443>. Acesso em 25 out. 2023.

MARQUES, P.R.C.; TRINDADE, R.V.R. Panorama epidemiológico dos surtos de doenças transmitidas por alimentos entre 2000 e 2021 no Brasil. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, v.3, n.3, p.1-10, 20 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.51161/rem/3477>.

ONU News - Organização das Nações Unidas. New York: ONU, 2022. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2022/04/1787412>. Acesso em 09 de nov 2023.

VAUGHAN, E.E.; HEILIG, H.G.H.J.; BEM-AMOR, K.; VOS, W.M. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol Rev*, v.29, p.477–490, 2005. DOI: 10.1016/j.femsre.2005.04.009. Acesso em 21 out 2023.

VILLARREAL, MARTHA LISSETE MORALES; PADILHA, MARINA; VIEIRA, ANTONIO DIOGO SILVA; FRANCO, BERNADETTE DORA GOMBOSSY DE MELO; MARTINEZ, RAFAEL CHACON RUIZ; SAAD, SUSANA MARTA ISAY. Advantageous Direct Quantification of Viable Closely Related Probiotics in Petit-Suisse Cheeses under In Vitro Gastrointestinal Conditions by Propidium Monoazide - qPCR. *PLoS One*, San Francisco, v. 8, p. e82102-11, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082102>. Acesso em 23 out 2023.

RECEBIDO EM:19.12.2023

ACEITO EM:25.01.2024