

Cadeia Produtiva do Leite e Derivados: PCR como Método de Controle da Qualidade Microbiológica

Jullie Angel Ruths (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) jullie-ruths@hotmail.com
Amanda Rocha Pietrochinski (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) amanda_pietroch@hotmail.com
Renata Samulak (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) renatasamulak@hotmail.com
Juliana Vitória Messias Bittencurt (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) julianavitoria@hotmail.com

Resumo:

O presente artigo tem como objetivo analisar os parâmetros de qualidade da cadeia produtiva do leite e seus derivados, parâmetro que envolve desde o início do processo, a partir da coleta do leite até o produto final. A necessidade de estabelecimento de parâmetros de qualidade, para que seja garantida a segurança microbiológica do produto final uma vez que o leite pode sofrer contaminações por microrganismos causadores de DTA'S, que podem trazer riscos a saúde do consumidor destes produtos. E diante do aumento da preocupação com os microrganismos que podem causar as DTA'S, nota-se há necessidade de utilizar novas técnicas para a detecção de microrganismos, que sejam de fácil aplicação e com os resultados rápidos e confiáveis, para que quando haja a necessidade de obter respostas rápidas em relação a contaminações em produtos lácteos seja possível utilizar técnicas mais simples. E com a utilização da técnica da PCR, podem-se obter resultados mais rápidos e confiáveis, em relação aos métodos convencionais que normalmente são utilizados para a análise de microrganismos contaminantes do leite e derivados. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi elencar os métodos de controle de qualidade microbiológico utilizado na cadeia produtiva de leite e derivados, com foco na utilização do diagnóstico de microrganismo via PCR.

Palavras chave: Leite e Derivados; Contaminações; Controle de Qualidade; PCR.

Productive Chain of Milk and Dairy Products: PCR as a Method of Microbiological Quality Control

Abstract

This article aims at analyzing the quality parameters of the production chain of milk and its derivatives, which involves parameter since the beginning of the process, from milk collection to final product. The need to establish quality parameters, so that it is guaranteed the microbiological safety of the final product once the milk may suffer contamination by microorganisms causing DTA'S, which can pose risks to consumer health these products. And the face of increasing concern with microorganisms that can cause the DTA'S, there is no need to use new techniques for the detection of microorganisms, which are easy to apply and with fast and reliable results, so that when there is a need for get quick answers in relation to contamination in dairy products is possible using simpler techniques. And with the use of the PCR technique, one can obtain more rapid and reliable compared to conventional methods which are usually used for analyzing microbial contaminants in milk and its derivatives. In this sense, the aim of this work was to list the methods of microbiological quality control used in the production chain of milk and dairy products, focusing on the use of diagnostic organism via PCR.

Key-words: Milk and dairy products; Contamination; Quality Control; PCR.

1. Introdução

O leite é um alimento que faz parte diariamente da dieta da população, seja na forma de produtos lácteos ou forma in natura, como é o caso do leite pasteurizado e UHT e, que ainda podem ser usados para o preparo de outros produtos na casa do consumidor.

De acordo com Bezerra (2011), entende-se por leite o produto que é oriundo de ordenha completa, ininterrupta em condições adequadas de higiene. Deve apresentar coloração branca, odor suave e sabor adocicado.

Também é notável o elevado número de produtos lácteos que estão disponíveis ao consumidor e que também fazem parte da dieta devido o importante papel nutricional que exercem.

Para que o leite e seus derivados cheguem a mesa do consumidor livres de riscos à sua saúde, é necessário que exista um rigoroso controle de qualidade em todas as etapas da sua cadeia produtiva.

Diante disso, a indústria tem verificado a necessidade de utilizar novos métodos que possam identificar possíveis contaminações no leite e seus derivados de maneira rápida, com resultados confiáveis, para que o risco de ocorrer surtos de DTA'S após o consumo destes alimentos sejam o mínimo possível, e garantindo assim, tanto a qualidade do produto como a satisfação do consumidor. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi elencar os métodos de controle de qualidade microbiológico utilizado na cadeia produtiva de leite e derivados, com foco na utilização do diagnóstico de microrganismos via PCR.

2. Indústria de leite e derivados

A indústria de leite e seus derivados mostra ser dentro do ramo alimentício uma das mais importantes, sendo que o consumo de produtos do gênero é elevado e tem importância para a dieta da população. A cadeia produtiva do leite e seus derivados mostram, no entanto, ser complexa em relação à qualidade do produto final, sendo que o processo produtivo depende de diversos fatores como a qualidade da matéria prima, pois o leite é um produto suscetível a contaminação de microrganismos quando não é adequadamente manipulado, processado e armazenado, podendo assim, trazer riscos de contaminação e conseqüentemente perda da qualidade do produto (BRITO et al, 2010).

Segundo Bezerra (2011), pelo fato do leite ser um produto com elevado valor nutricional, visto que possui diversas substâncias como vitaminas, proteínas, minerais lipídeos, glicídios entre outras, é usado tanto para consumo in natura quanto para a produção de produtos como queijos, iogurtes, manteiga, doce de leite. Fatores que fazem com que o leite tenha grande importância comercial e que seu consumo seja elevado a nível mundial.

No Brasil a produção do leite em 2012, chegou mais de 33 bilhões de litros, e o consumo per capita de leite teve alta de 3% em relação à 2011 sendo o consumo por habitante em torno de 180 litros. Para 2013 há estimativas que tanto a produção quanto o consumo do leite in natura devem aumentar ainda mais (SILVEIRA, 2013).

A cadeia produtiva do leite tem início, na propriedade rural, em que é feita a coleta do leite que vai ser beneficiado, ou seja, a ordenha. Nesta etapa de coleta é necessário tomar cuidados a fim de se evitar a contaminação do leite, principalmente em relação a higiene do local onde é realizada a ordenha, higienização correta de todos os equipamentos após a realização das ordenhas e boas práticas de manipulação dos funcionários que vão estar envolvidos nesta etapa. Depois de recolhido o leite é transportado para a indústria de beneficiamento, este transporte deve ser feito em tanques refrigerados. Ao chegar até o local

do beneficiamento este leite também é armazenado em tanques de resfriamento para que seja possível realizar análises para determinar a qualidade ou possíveis fraudes do leite, somente depois desta etapa o leite pode ser processado. Após o processamento é possível escolher a classe do leite que vai ser utilizado para a produção de seus derivados. Todos os cuidados devem ser tomados durante as etapas de ordenha, transporte e armazenamento para que seja possível garantir a qualidade do leite que será beneficiado. (DÜRR, 2009)

Para que seja possível garantir a qualidade do leite durante a ordenha, transporte, armazenamento e sua qualidade que depende de fatores como composição, cor, odor, contagem de células somáticas e de microrganismos. A instrução normativa nº 51 de 2002 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento define os parâmetros quanto à classificação dos tipos de leite e as características que são atribuíveis a cada um destes tipos, os cuidados que devem ser tomados quanto ao armazenamento do leite e também com os equipamentos envolvidos durante todo o seu processamento que vai desde os cuidados na propriedade em que é realizada a ordenha até o seu beneficiamento final. (BRASIL, 2002)

Em relação à carga microbiana que pode conter no leite sem trazer riscos a saúde do consumidor, os parâmetros estabelecidos dependem do tipo de leite que pode ser classificado em: leite tipo A, tipo B e tipo C que é estabelecida conforme a maneira de produção e quantidade de microrganismos no leite. O leite tipo A possui um controle mais rigoroso em relação a sua produção e quantidade de microrganismos, ele é pasteurizado e embalado na própria fazenda. O leite tipo B logo após a ordenha é resfriado e enviado para a indústria para ser pasteurizado e em seguida ser embalado, já o leite tipo C pode ser produzido em qualquer tipo de propriedade, mas possui um controle de qualidade menor em relação a carga microbiana. (VENTURINI et al, 2007)

3. Microrganismos que contaminam o leite e seus derivados

O leite é um produto que dificilmente vai ser obtido sem nenhum tipo de contaminação, a sua contaminação pode ocorrer, no momento em que o leite é coletado ou durante o seu processamento. Os microrganismos que podem causar contaminação no leite e seus derivados podem ser patogênicos ou saprófitos que também podem ser chamados de contaminantes ou deterioradores, ou seja, são aqueles que apenas causam a deterioração do produto alterando assim suas características sensoriais, e vida de prateleira. Os principais agentes contaminantes dos produtos lácteos são as bactérias, em que se destacam as bactérias ácido-lácticas, os microrganismos psicotróficos, coliformes, bactérias termodúricas, termofílicas, formadoras de esporos, bactérias causadoras de mastite, bolores e leveduras e microrganismos patogênicos (LANGE et al, 2005).

A presença dos microrganismos deve-se principalmente ao fato do leite e de seus derivados, apresentarem valor nutritivo elevado, constituindo desta forma um excelente meio de cultura para o crescimento de microrganismos que podem transmitir doenças ao consumidor, quando apresentarem uma alta carga microbiana (CATÃO et al, 2001).

Porém, nem todas as classes de bactérias causam prejuízos ao leite e seus derivados, como é o caso das bactérias lácticas que se tratando deste tipo de produto tem grande importância, sendo que na maior parte das vezes fazem parte da flora que fermenta a lactose formando assim o ácido láctico e o ácido pirúvico importantes na fabricação produtos lácteos fermentados (TRONCO, 1997).

As classes de microrganismos que contaminam o leite e seus derivados dependem de alguns fatores como: a temperatura de refrigeração do leite, a higiene durante a manipulação do leite e a temperatura de pasteurização. As bactérias mesófilas multiplicam-se quando o leite não é armazenado sob-refrigeração nestes casos as bactéria que podem se multiplicar rapidamente no leite são os *Lactobacilos*, *Streptococos* e *Coliformes*. Dentre os coliformes,

os principais gêneros de responsáveis por contaminação são: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. A presença de um alto número de coliformes indica falta de higiene durante a ordenha, equipamentos mal higienizados que entram em contato com o leite ou água contaminada. A principal fonte destes microrganismos é o trato intestinal dos animais ou no ambiente (LANGE et al, 2005).

As bactérias termodúricas resistem a altas temperaturas e produzem esporos, resistindo, assim, a pasteurização, e pelo fato de produzirem esporos podem diminuir a validade do produto. A elevada taxa de bactérias termodúricas pode estar associada à falta de higiene dos equipamentos da ordenha ou as tetas do animal sujas. As bactérias que podem causar contaminação nestes casos são as dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus thermophilus*, *Microbacterium lactium*, e algumas espécies de *Micrococcus spp* (BRITO et al, 2007)

As bactérias psicotróficas podem se multiplicar a baixas temperaturas sendo as que mais contribuem para deterioração do leite e seus derivados. Os principais gêneros das bactérias psicotróficas que causam contaminação nos produtos lácteos são os não patogênicos como: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Lactococcus*. Mas, também há as bactérias psicotróficas que estão associadas com as intoxicações alimentares como é o caso da *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus*. A presença destes microrganismos pode estar associada à falta de higiene durante a ordenha, resfriamento inadequado ou por um longo período (BRITO et al, 2007).

Os microrganismos patogênicos são os principais agentes de transmissão de doenças infecciosas para o ser humano por consumo de leite. Sendo os que mais provocam o risco de doenças e devem ser controlados são: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, e *Staphylococcus aureus*. A maioria dos microrganismos patogênicos é destruída durante o processo de pasteurização, no entanto há o risco de contaminação devido à presença das enterotoxinas que podem ser produzidas por algumas bactérias e não são inativadas pelo calor (BRITO et al, 2007).

Mesmo com a variedade de espécies que podem causar contaminação no leite, a maior preocupação está relacionada com os surtos de Salmonelose e Listeriose associado ao consumo do leite e seus derivados. Tal fator fez com que as indústrias redobrassem a atenção em relação aos tempos e temperaturas do processo de pasteurização, a fim de evitar a presença desses microrganismos (LANGE et al, 2005).

O leite também pode estar contaminado antes de ser realizada a ordenha no animal, e consequentemente durante a realização da mesma já vai apresentar contaminação, que pode ser ocasionada devido à presença de aflatoxinas no leite do animal, que são substâncias tóxicas produzidas por espécies de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. A principal causadora de contaminação no leite é a aflatoxina M1, que é ocasionada pela presença da aflatoxina B1 na ração que é ministrada para o rebanho que ao ser ingerida pelo animal é absorvida pelo trato gastrointestinal, passa pelo sistema sanguíneo e em seguida é transportada para o fígado aonde acontece a sua metabolização e sofre um processo de biotransformação formando a aflatoxina M1 que é excretada pelo sistema sanguíneo e distribuí-se por via sistêmica e é transferida para o leite e demais tecidos do animal (FARIAS et al, 2005).

É uma toxina que possui grande potencial carcinogênico e genotóxico, sendo que a presença da alfatoxina M1 em leite e derivados é considerada um problema de saúde pública. (SOUZA et al, 2000)

Diante disso, é preciso ter maior atenção quanto aos microrganismos que causam contaminações nestes produtos e que podem gerar o risco de graves surtos de DTA'S, ao consumidor final (TRONCO, 1997). Para tanto, análises microbiológicas se fazem necessárias, como ferramenta no controle de segurança alimentar desses produtos.

Portanto, a necessidade de aprimoramento dos métodos de controle de qualidade dos produtos lácteos que possam ser usados de maneira preventiva a fim de evitar a contaminação do leite e derivados, realizando a inserção de metodologias mais rápidas e eficientes para diagnóstico desses patógenos, a fim de facilitar o controle da qualidade durante todo o processo produtivo.

4. Segurança Alimentar

Quando o assunto é segurança alimentar, deve-se considerar como principal aspecto a qualidade do alimento que será consumido, o alimento não deve fornecer qualquer risco a contaminação a população, não deve apresentar-se com problemas relacionados à sua deterioração ou prazo de validade vencido (BELIK, 2003).

A preocupação com a segurança alimentar tem se mostrado crescente, pelo fato do aumento do consumo de alimentos e da preocupação com a qualidade do que se consome diariamente, e com possíveis riscos de contaminação caso o alimento tenha sido processado de forma inadequada.

Em relação ao consumo de leite e seus derivados, o principal risco de contaminação se deve a possível presença de microrganismos patógenos que possam se multiplicar ou ainda produzir toxinas no alimento e, conseqüentemente causar casos clínicos de doenças quando ingeridos em elevadas concentrações.

As doenças transmitidas por alimentos são um grande problema de saúde pública, apesar das constantes melhorias no controle da qualidade e segurança dos alimentos. Para Leite (2010) o alto índice de incidências das DTA'S pode se devido a ocorrência de fatores como: a produção e distribuição dos alimentos em larga escala, modificações nas práticas de preparo dos alimentos, a falta de conhecimento da população, maior exposição a alimentos inseguros que tenham sido preparados e conservados de maneira inadequada.

DTA'S são causadas, por agentes que penetram no organismo humano após a ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas por agentes químicos ou biológicos, no entanto os alimentos contaminados por agentes biológicos são os principais causadores dos surtos de DTA'S, devido o fato de aparentemente o alimento apresentar características que indicam estar aptos a ser consumidos (AMSON et al, 2006).

Tais doenças são classificadas em infecções, intoxicações e infecções mediadas por toxinas. As infecções são resultado da ingestão do alimento contendo os microrganismos vivos. As intoxicações podem ser causadas quando o alimento contém as toxinas produzidas pelos microrganismos. E as infecções mediadas por toxinas ocorrem quando após a ingestão do alimento ocorra a produção das toxinas dos microrganismos devido a presença de uma carga microbiana que ainda possa produzir as toxinas (BAPTISTA et.al, 2005).

Para pessoas adultas e sadias as DTA'S costumam durar poucos dias, mas para crianças, idosos, grávidas e pessoas doentes, as conseqüências das DTA'S podem se apresentar de maneira mais grave podendo levar a morte. (BRASIL, 2007)

5. Controle de qualidade em laticínios

O controle de qualidade é uma das principais etapas da cadeia produtiva do leite, sendo que é a partir deste controle que se define a segurança e qualidade do produto final evitando assim perda de matéria prima e insatisfação do consumidor, tratando-se da contaminação por bactérias os parâmetros definidos para o controle de qualidade são: baixa contagem de bactérias que se deve ao fato da impossibilidade obtenção de um leite livre de contaminação, ausência de microrganismos patogênicos e baixa contagem de células somáticas que em elevada quantidade podem alterar a qualidade do leite e dos produtos que possam usar o leite como matéria prima (BRITO et al , 2007).

O controle de qualidade deve ter início durante a ordenha do leite para evitar a contaminação inicial do produto, e deve ser seguido durante todo o seu processamento.

Logo depois da ordenha o leite deve ser armazenado sob refrigeração, e em seguida transportado até os laticínios que irão realizar o beneficiamento em caminhões isotérmicos para manter o leite a uma baixa temperatura, ao chegar aos laticínios os equipamentos usados para recepção, armazenamento e beneficiamento devem ser os mais higiênicos possíveis para evitar a contaminação do leite. É durante o beneficiamento do leite que ele irá ser padronizado e com esta etapa o laticínio dá ao leite o seu destino final que pode ser para a produção de leite pasteurizado, leite UHT, queijos, doce de leite, requeijão, iogurtes, bebidas fermentadas. A destinação do leite cru depende do produto que o laticínio quer obter. Mas independente da destinação que será dada ao leite os cuidados em relação ao risco de contaminação serão os mesmos, pois envolvem os cuidados em relação a higiene durante o processo produtivo como: higiene adequada dos utensílios utilizado, boas práticas de manipulação e fabricação e armazenamento adequado do produto antes e depois do beneficiamento (SILVA et.al, 2012).

O controle de qualidade deve ter como principal objetivo, a preocupação de evitar qualquer tipo de contaminação que possa atingir o leite e seus derivados, nota-se que o controle da presença de microrganismos, depende principalmente dos cuidados durante a cadeia produtiva do leite e dos seus derivados, cuidados que abrangem desde o manejo dos animais durante a realização das ordenhas, higiene no local de realização da ordenha, transporte do leite para o seu futuro beneficiamento e controle das operações realizadas durante o beneficiamento final independentemente do produto que se vai ser obtido, o controle deve ser rigoroso em cada etapa do processo com o objetivo de evitar o elevado número de microrganismos que possam trazer riscos ao consumidor final ou acelerar o processo de deterioração do mesmo.

6. Métodos para controle de qualidade microbiológica

Existem vários métodos que podem ser empregados para a detecção e quantificação de microrganismos em produtos lácteos. Metodologias que são usadas de maneira rotineira nos laboratórios e servem como referências para instituições de pesquisas e entidades de fiscalização. Porém as metodologias usadas para a realização destas análise são demoradas e trabalhosas, fato que acaba causando dificuldades quando há a necessidade de implantar ações corretivas de maneira rápida no processo a fim de se evitar a contaminação dos produtos lácteos (CUNHA et al, 2012).

De maneira geral as análises padrão usadas para a detecção de microrganismos presentes no leite seus derivados são baseados na contagem padrão das colônias de bactérias por métodos de plaqueamento, que demonstram ser demorados devido aos tempos necessários de preparo e incubação das placas para a obtenção dos resultados.

Considerando que as principais bactérias, causadoras de DTA'S são as do gênero *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, o método convencional torna-se uma barreira para a obtenção de resultados mais rápidos, pelo fato de que na análise microbiológica convencional usada para determinação de *Salmonella* há a necessidade de 4 ou 5 dias para a obtenção dos

resultados (DICKEL et al, 2005). Dentre os métodos rápidos de detecção tanto de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* tem-se disponível a metodologia Elisa, e o método da PCR em que se podem obter resultados rápidos e precisos.

A metodologia Elisa é baseada no princípio da interação entre anticorpo e antígeno, apresenta dois passos, que são a reação entre o anticorpo e antígeno e em seguida a revelação da reação pela hidrólise enzimática. O teste Elisa é indicado como teste para rastreamento ou como teste qualitativo pra análise de alimentos de origem animal ou vegetal, podendo também ser usado para quantificar aflatoxinas em alimentos. (MOTTA et al, 2010)

Na realização de análises com a metodologia Elisa, normalmente usa-se anticorpos policlonais e monoclonais, em que para a realização destas análises pode-se usar kits que já pronto para o uso e possuem especificidade e sensibilidade diferentes na detecção de microrganismos. O teste ELISA pode ser considerado uma alternativa para o diagnostico da presença ou não de cepas das bactérias (MARASSI, 2006).

Na realização das análises com a metodologia Elisa, na maioria das vezes não há a necessidade de purificação e extração da amostra, tornando-a rápida e simples de ser realizada no entanto existem desvantagens na utilização desta metodologia como o prazo de validade limitado e a possibilidade de obter resultados falso positivos que podem vir acontecer devido reações cruzadas, tornando-o assim uma metodologia com baixa confiabilidade e precisão em relação aos resultados obtidos, em que é necessário a realização de outros métodos para ter certeza do resultado indicado (SOUZA et al, 2000).

Mostrando assim a importância da necessidade de novas metodologias para a realização de análises que apresentem maior confiabilidade e precisão em relação aos resultados necessários para garantia da qualidade na cadeia produtiva do leite e derivados, metodologias como a PCR que tem se mostrado confiável em relação aos resultados obtidos em análises.

6.1 PCR

A técnica da reação em da cadeia polimerase a chamada PCR, é um método molecular considerado revolucionário, pelo fato ser rápida. É uma técnica que promove devido à variação das temperaturas a duplicação das cadeias de DNA in vivo, ou seja, não há a necessidade de utilizar um organismo vivo. A reação da amplificação do DNA por PCR envolve o uso de quatro nucleotídeos do DNA, sequencias iniciadores que são chamados de primers e um DNA polimerase estável. (MICHELIM et. al, 2008).

A PCR é uma técnica que envolve três técnicas básicas, em que irá ocorrer a variação de temperatura durante cada uma das etapas. Na primeira etapa é realizada a desnaturação da fita molde de DNA com uma duração de trinta segundos a um minuto e é realizada a temperatura de 92 a 96°C. Na segunda etapa ocorre o pareamento de dois iniciadores sintéticos com composições distintas que funcionam como os iniciadores da reação de polimerização e ligam-se á região complementar da fita do DNA alvo que vai sofrer a duplicação, esta etapa dura de trinta segundos a um minuto com temperatura entre 58°C e 65°C. A terceira etapa consiste na amplificação das novas fitas de DNA por meio da enzima taq DNA polimerase a partir de cada um dos iniciadores, utilizando os quatro dNTP's como substrato da reação de polimerização, esta etapa dura entre quarenta e cinco segundos e um minuto a 72°C (MICHELIM et. al, 2008).

Para a detecção de microrganismos pelo método da PCR, pode-se realizar a amplificação do DNA a partir de uma colônia, de cepas do microrganismo ou de uma amostra que possa estar contaminada pelo patógeno que precisa ser identificado. Para a realização da PCR há a necessidade da escolha de um gene do microrganismo para a realização da amplificação do mesmo (MAZO et al, 2010).

Para realizar a PCR, é necessário realizar a extração do DNA do microrganismo, a extração pode ser feita com o uso de alguns compostos e estes irão depender das características do patógeno que se pretende analisar pelo método da PCR (CATTANI et al, 2010). A extração do DNA é uma etapa que interfere diretamente nos resultados que podem ser obtidos na PCR, pelo fato de que se durante a extração do DNA houver erros que possam afetar a qualidade da sua visualização, ou a não visualização da faixa de DNA o resultado final pode ser comprometido e não atingir o esperado.

A PCR tem sido aplicada na indústria de leite e derivados, pra a detecção de microrganismos que possam causar a contaminação destes produtos. Para a realização das análises por PCR é possível extrair o DNA do leite e dos produtos lácteos que já estejam processados e em seguida realizar a amplificação do DNA da caseína presente nestes produtos (OLIVEIRA, 2012). É uma técnica que apresenta elevada sensibilidade e especificidade e os resultados podem ser obtidos rapidamente, é um dos principais métodos utilizados para a detecção de *Escherichia Coli* nos produtos lácteos (CARVALHO, 2009).

A utilização da PCR no diagnóstico da presença de microrganismos mostra ser uma técnica viável e que apresenta a capacidade de substituir os métodos convencionais das análises microbiológicas nos produtos lácteos, sendo que apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais que normalmente são utilizados como: bom limite de detecção dos microrganismos, uma seletividade e especificidade mais elevada em relação aos métodos convencionais e resultados obtidos de maneira mais rápida (GANDRA, 2006).

Em um estudo desenvolvido por Garcia (2008), no laboratório da Embrapa leite, com o objetivo de avaliar a eficiência da PCR multiplex e de um método de cultivo convencional para a detecção de *Escherichia Coli*_O157:H7 foi possível observar que a PCR mostrou-se eficiente pra a detecção de *E. Coli*_O157:H7 que foi inoculada em um leite estéril e em seguida enriquecida em caldo EC, a eficiência desta análise se deve ao fato de que foram utilizados dois métodos de extração do DNA sendo eles com fenol-clorofórmio seguido de lise térmica que foi adotada devido a sua rapidez e simplicidade. Segundo a conclusão do artigo o método da PCR mostrou elevada sensibilidade na detecção do patógeno e especificidade total para a detecção do patógeno, mas a sua capacidade de detecção varia conforme a contaminação bacteriana do leite cru com o patógeno.

Em outro estudo realizado por Hartmann (2009) que tinha como objetivo, analisar a presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de leite cru de 34 propriedades da região oeste do Brasil que é a quarta região do país que mais produz leite a técnica da PCR foi utilizada para a confirmação da presença deste microrganismo no leite, em que após a realização da metodologia convencional para a sua detecção as colônias típicas de *Listeria monocytogenes* presentes no ágar- aloa que foi utilizado para realizar o plaqueamento na metodologia convencional, foram submetidas ao método por PCR em que colônias isoladas foram utilizadas para as etapas de extração e amplificação do DNA, o primer utilizado para a extração do DNA foi o LL e os resultados obtidos na análise por PCR também foram positivos para a presença de *Listeria monocytogenes*, fato que mostra que a utilização da técnica da PCR para a identificação de microrganismos é confiável e os resultados obtidos apresentam a mesma eficiência dos obtidos com metodologia convencional.

É possível observar que a técnica da PCR, apresenta-se como uma metodologia que pode substituir as metodologias convencionais que são utilizadas para as análises na cadeia produtiva do leite, já que os resultados obtidos apresentam-se de maneira satisfatória e podem facilitar a realização das análises que podem levar um tempo menor para serem concluídas.

Conclusão

A utilização de novas técnicas para determinação de microrganismos em leite e derivados é de suma importância, já que a principal preocupação da indústria deve ser a

qualidade do produto que esta colocando a disposição do consumidor, a fim de evitar qualquer tipo de risco a sua saúde. Métodos que possam permitir a obtenção de resultados rápidos quanto a presença de microrganismos devem ser melhor aproveitados e estudados afim de permitir o avanço no controle de qualidade da cadeia produtiva do leite. A metodologia da utilização da PCR para a determinação dos principais patógenos causadores de DTA'S em produtos lácteos mostra ser viável já que é uma metodologia simples de ser realizada e os resultados são obtidos de maneira rápida, diminuindo assim a necessidade de um elevado tempo para a obtenção de resultados quanto à presença ou não dos microrganismos causadores de surtos de DTA'S.

Referências

AMSON, Gisele Van et al. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (dtas) no estado do paraná – brasil, no período de 1978 a 2000. *ciênc. agrotec., lavras*, v. 30, n. 6, p.1139-1145, 16 fev. 2006. disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1413-70542006000600016&lang=pt>. acesso em: 01 set. 2013.

ANDRADE, R.B et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: campylobacter sp., salmonella sp. e listeria monocytogenes. *arq. inst. biol, são paulo*, v. 77, n. 4, p.741-750, 21 jul. 2010. disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_4/andrade.pdf>. acesso em: 08 set. 2013.

BAPTISTA, Paulo; ANTUNES, Christine. Doenças Associadas a Alimentos. In: **BAPTISTA, Paulo; ANTUNES, Christine.** Higiêne e Segurança Alimentar na Restauração. 1º [s.l]: Forjição, 2005. Cap. 1, p. 4-139. Disponível em: <http://esac.pt/noronha/manuais/restaura%C3%A7%C3%A3o_VOL_2.pdf>. Acesso em: 01 set. 2013.

BELIK, Walter. Perspectivas para segurança alimentar e nutricional no Brasil. *Saúde e Sociedade, São Paulo*, v. 12, n. 1, p.12-20, 12 maio 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-12902003000100004&script=sci_arttext>. Acesso em: 03 set. 2013.

BEZERRA, José Raniere Mazile Vidal et al. Introdução à Tecnologia de Leite e Derivados. Guarapuava: Unicentro, 2011. 192 p.

BRASIL. Instrução normativa nº 51 de 18/09/2002. Disponível em: <<http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/EMATER/DOC/DOC00000000001051.PDF>>. Acesso em: 30 set. 2013

BRASIL. Doenças Transmitidas por Alimentos e Água. Biblioteca Virtual em Saúde. Elaborado em dez, 2007 Disponível em: <http://bvsm.sau.de.gov.br/bvs/dicas/148doencas_alim_agua.html/>. Acesso em: 06 set. 2013.

BRITO, A. Maria; et.al. Tipos de Microrganismos 2005-2007. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_182_21720039246.htm> Acesso em : 4 set. 2013

CARVALHO, Rosângela Nunes. Emprego das técnicas de pcr e vidas na determinação da escherichia coli o157:h7 em queijos minas frescal em feiras livres e estabelecimentos sob inspeção federal. 2009. 60 f. Dissertação (Mestre) - Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal De Goiás Escola De Veterinária, Goiânia, 2009. Disponível em: <http://portais.ufg.br/uploads/67/original_Dissertacao2009_Rosangela_Nunes.pdf>. Acesso em: 30 set. 2013.

CATÃO, R. M. R. et al. listeria spp., coliformes totais e fecais e e.coli no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). *Ciência e Tecnologia Alimentar, Campinas*, v. 21, n. 3, p.281-287, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612001000300006&lang=pt>. Acesso em: 04 set. 2013.

CATTANI, Fernanda; FERREIRA, Carlos Alexandre Sanchez; OLIVEIRA, Sílvia Dias . Detecção de células viáveis de Bacillus sporothermodurans através de PCR. In: v mostra de pesquisa da pós graduação, 5., 2010, Rio Grande Sul. mostra de pesquisa. Rio Grande Sul: Pucrs, 2010. p. 42 - 44. Disponível em: <http://www.pucrs.br/edipucrs/Vmostra/V_MOSTRA_PDF/Biologia_Celular_e_Molecular/82653-FERNANDA_CATTANI.pdf>. Acesso em: 07 set. 2013.

CUNHA, A.F et al. Avaliação da qualidade microbiológica de bebida láctea e creme de leite UAT por ATP-Bioluminescência. Zootecnia E Tecnologia E Inspeção De Produtos De Origem Animal, Belo Horizonte, v. 54, n. 2, p.595-600, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352013000200041&lang=pt>. Acesso em: 09 set. 2013.

DICKEL, Elci Lotar et al. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de Salmonella enteritidis, S. typhimurium, S. gallinarum e S. pullorum em carne de frango contaminada artificialmente. Revista Brasileira Ciência Veterinária, v. 12, n. , p.5-10, 2005. Disponível em: <www.uff.br/rbcv/site/index.php/pages/process?file=Artigo/107/>. Acesso em: 09 set. 2013

DÜRR, J. W. Produção de Leite Conforme Instrução Normativa N °51. 3° Brasília, Senar, 2009. 47 p. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/133%20-%20LEITE.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2013

FARIAS, Antônio Xavier; et al. Aflatoxina M1 em Leite: Um Risco para a Saúde Pública, 2005 Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/aflotoxinaemleite_000fdq9bwuz02wx5eo0a2ndxy7hqs2rk.pdf>. Acesso em: 28 set.2013.

GANDRA, Eliezer Avila. Multiplex pcr para detecção de s. Aureus, s. Intermedius e s. Hyicus em leite uht artificialmente contaminado. 2006. 82 f. Pos Graduação (Mestre) - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial,, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006. Disponível em: <http://www.dcta.create.inf.br/manager/uploads/documentos/teses/tesegandra_24_02_2006.pdf>. Acesso em: 30 set. 2013.

GARCIA, P.M. et al. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, vol.60, n.5, p. 1241-1249,2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352008000500029&lang=pt>. Acesso em: 09 set.2013

HARTMANN W. et al. Qualidade microbiológica do leite cru produzido na região oeste do Paraná e ocorrência de listeria monocytogenes Ars Veterinária, Jaboticabal, sp ,v.25, n.2, 072-078, 2009. disponível em < <http://arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/viewFile/275/189>> Acesso em : 30 set.2013.

LANGE, C. Carla; BRITO, José Renaldi Microrganismos que deterioram a qualidade do leite. Belo Horizonte: Rehagro, ago. 2005. Disponível em: <<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=728>>. Acesso em: 05 set. 2013

LEITE, Luísa Helena Maia et al. Doenças transmitidas por alimentos na população idosa: riscos e prevenção. Ciências Médicas, Campinas, v. 15, n. 6, p.525-530, 05 dez. 2010. Disponível em: <periodicos.puccampinas.edu.br/seer/index.php/cienciasmedicas/.../1058>. Acesso em: 09 set. 2013

MARASSI, Carla Dray et al. Comparação de uma in-house e um ensaio imunoenzimático comercial (ELISA) para o diagnóstico de paratuberculose. Brazilian Journal Of Microbiology, São Paulo, v. 38, n. 1, p.6-8, 13 out. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000100002&lang=pt>. Acesso em: 09 set. 2013.

MAZO, Jaciara Zarpellon; ILHA, Eunice Cassanego; ARISI, Ana Carolina M. Bifidobactérias: Isolamento, identificação e aplicação em alimentos probióticos. B.ceppa,, Curitiba, v. 27, n. 1, p.119-134, 2009. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/14958>>. Acesso em: 08 set. 2013.

MICHELIM, Lessandra; MULLER, Gabriela; ZACARIA, Jucimar. Comparação de marcadores moleculares baseados em PCR para a caracterização de Proteus mirabilis isolados clínicos. Brazilian Journal Of Infectious Diseases, Campinas, v. 12, n. 5, p.423-429, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702008000500014&lang=pt>. Acesso em: 12 set. 2013

MOTTA, T.P. e DUARTE, K.M.R. ELISA na detecção de aflatoxinas em alimentos. PUBVET, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 989, 2010. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/imagens/artigos/1912011-100116-duarte989.pdf>>. Acesso em 28 set.2013

OLIVEIRA, Carolina Souza Victor De. Detecção de escherichia coli o157:h7 em leite armazenado em diferentes condições por PCR. 2012. 58 f. Dissertação (Pos Graduação) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012. Disponível em: <http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/M_carolina_victor.pdf>. Acesso em: 30 set. 2013.

SILVA, Gilvan et al. Produção Alimentícia: Processamento de leite. 1º Recife: Ufrpe, 2012. 172 p. Disponível em: <http://www.ifpr.edu.br/pronatec/wp-content/uploads/2013/06/Processamento_de_Leite.pdf>. Acesso em: 01 set. 2013

SILVEIRA, Roberta, Cadeia do Leite: Produção leiteira cresce 3% em 2012 e preço pago ao produtor é o maior em cinco anos, 29/07/2013. Disponível em < <http://pecuaria.ruralbr.com.br/noticia/2013/07/producao-leiteira-cresce-3-em-2012-e-preco-pago-ao-produtor-e-o-maior-em-cinco-anos-4216349.html> >. Acesso em: 30 set. 2013

SOUZA, Scheilla V. C. et al. Eficiência de um kit de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M1 em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/veiculos_de_comunicacao/CTA/VOL19N3/VOL19N3_18.PDF>. Acesso em: 28 set. 2013.

TRONCO, Vania Maria. Manual para a Inspeção da Qualidade do Leite. 1º Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1997. 166 p.

VENTURINI, Katiani Silva et al. Características do Leite. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2007 Disponível em: <http://www.agais.com/telomc/b01007_caracteristicas_leite.pdf>. Acesso em: 30 set. 2013.