

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO**

MARJORY XAVIER RODRIGUES

**PROPOSTA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NO CONTROLE DE
QUALIDADE DA PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL**

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2013

MARJORY XAVIER RODRIGUES

**PROPOSTA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NO CONTROLE DE
QUALIDADE DA PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Produção, do Programa de Mestrado em Engenharia de Produção: Área de Concentração: Gestão da Inovação Agroindustrial, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Vitória
Messias Bittencourt

PONTA GROSSA

2013

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa
n.06/12

R696 Rodrigues, Marjory Xavier

Proposta de inovação tecnológica no controle de qualidade da produção
agroindustrial / Marjory Xavier Rodrigues. -- Ponta Grossa, 2013.
106 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profª. Drª. Juliana Vitória Messias Bittencourt

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Tecnológica Federal do
Paraná. Ponta Grossa, 2013.

1. Inovações tecnológicas. 2. Alimentos - Indústria. 3. Reação em cadeia de
polimerase (PCR). 4. Diagnóstico molecular. 5. Controle de qualidade. I. Bittencourt,
Juliana Vitória Messias. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus
Ponta Grossa. III. Título.

CDD 670.42



Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PRODUÇÃO**



FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação Nº 214/2013

**PROPOSTA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NO CONTROLE DE QUALIDADE DA
PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL**

por

Marjory Xavier Rodrigues

Esta dissertação foi apresentada às **14 horas e 30 minutos de 06 de fevereiro de 2013** como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, com área de concentração em Gestão Industrial, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo citados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof.^a Dr.^a Maike Taís Maziero Montanhini
(UTFPR)

Prof.^a Dr.^a Eloiza Aparecida Silva Avila de
Matos (UTFPR)

Prof.^a Dr.^a Maria Helene Giovanetti Canteri
(UTFPR)

Prof.^a Dr.^a Juliana Vitoria Messias
Bittencourt (UTFPR) - *Orientador*

Prof. Dr. João Luiz Kovaleski (UTFPR)
Coordenador do PPGEP

A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE NO DEPARTAMENTO DE
REGISTROS ACADÊMICOS DA UTFPR –CÂMPUS PONTA GROSSA

*À minha mãe Izaura Xavier,
que sempre me ajudou nos dias difíceis
com muito carinho e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por todas as coisas e por ter me dado muito mais do que eu imaginei nesta etapa da minha vida.

À Prof^a Juliana, minha orientadora, que com muita dedicação e carinho me ensinou muito sobre pesquisa e vida, para mim um exemplo.

À minha família, que sempre está ao meu lado, sem esta base fundamental nada seria possível.

À minha mãe, em especial, pelo apoio, amor, carinho, compreensão, respeito e orações.

Ao PPGEP, aos professores e à UTFPR pela oportunidade e auxílio em todos os momentos que precisei.

À banca examinadora, Prof^a Maike, Prof^a Eloiza e Prof^a Maria Helene que aceitaram contribuir com esta pesquisa.

À equipe do laboratório de Bioengenharia, especialmente Andiará, Renata e Gabriela.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À todos os colegas e professores que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

RODRIGUES, Marjory Xavier. Proposta de inovação tecnológica no controle de qualidade da produção agroindustrial. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2013.

Programas de controle de qualidade de alimentos baseados na detecção de patógenos incluem técnicas que apresentam desvantagens, como longo tempo de análise, alto custo de implementação, alto risco de interpretação errônea e a não detecção de certos micro-organismos, pois características podem não ser expressas e ainda pode haver a presença de células viáveis, mas não cultiváveis. Desta forma, surge a necessidade de alternativas às técnicas tradicionais. As técnicas moleculares representam uma inovação tecnológica de importância, mas enfrentam dificuldades na sua implantação. Assim, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar os fatores limitantes da adoção de técnicas moleculares nos laboratórios de microbiologia de alimentos da região dos Campos Gerais, Paraná. Para isso, foi desenvolvido questionário semi-estruturado, o qual foi avaliado e posteriormente aplicado em laboratórios de microbiologia de seis empresas do ramo alimentício da região dos Campos Gerais. Além disso, ensaios experimentais foram realizados para o desenvolvimento de diagnóstico molecular para detecção de *Staphylococcus aureus* em alimentos. Extrações de DNA por diferentes métodos foram aplicadas, reações para a detecção dos genes *coa* e *nuc A* foram padronizadas e fez-se a aplicação da detecção molecular em amostras de alimentos naturalmente contaminadas. A partir dos resultados, o Bax[®] System foi indicado como a técnica molecular aplicável na rotina laboratorial da indústria de alimentos. Por outro lado, os resultados dos levantamentos, da padronização de PCR e da aplicação da técnica em amostra alimentícia apontaram alguns fatores limitantes à adoção de técnicas moleculares. Esses fatores são: a falta de conhecimento dos gestores em relação a informações científicas; a legislação brasileira, que se detém a métodos convencionais abrindo a necessidade de trabalhos como este; a falta de recursos financeiros para adquirir equipamentos específicos requeridos pela tecnologia; a necessidade de suporte profissional especializado em diagnóstico molecular, pois na padronização a experiência é necessária para o aperfeiçoamento da técnica às condições do laboratório bem como no treinamento dos analistas; e por fim o tempo gasto para os ajustes dos protocolos. Espera-se com estes resultados que os limitantes sejam suplantados e a inovação tecnológica proposta seja adotada, assim as empresas e os consumidores serão beneficiados com a aplicação de ferramentas analíticas de alto desempenho.

Palavras-chave: Limitantes. Inovação. Diagnóstico molecular. PCR. Alimentos.

ABSTRACT

RODRIGUES, Marjory Xavier. Proposal for technological innovation in quality control of agro-industrial production. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2013.

Food Quality control programs based on pathogens detection have techniques that exhibit disadvantages, which are long periods of analysis time, high cost of implementation, high risk of misinterpretation and failure to detect specific microorganisms because its characteristics cannot be expressed and still they can be present viable cells, but not cultivable. Therefore, emerge the need for alternatives to traditional techniques. Molecular techniques represent an important technological innovation, but face difficulties in its insertion. So, the objective of this research was to characterize the factors limiting the adoption of molecular techniques in food microbiology laboratories in the region of Campos Gerais, Paraná State. For this, it was developed semi-structured questionnaire. This questionnaire was evaluated and applied in microbiology laboratories of six companies of the food sector from Campos Gerais region. Furthermore, experimental trials were carrying out to development of molecular diagnostics for detecting *Staphylococcus aureus* in food. DNA extractions by different methods was applied, reactions for the detection of *coa* and *nuc A* genes was standardized and application of molecular detection in food naturally contaminated samples was realized. As the results, the Bax® System was indicated as the molecular techniques applicable in laboratory routine of food industry. In other hands, the results of surveys, standardization and development of PCR technique in food sample showed some factors limiting for the adoption of molecular techniques. The factors are: the lack of managers knowledge about scientific information; the Brazilian law that presents conventional methods, opening the need for research like this; the lack of financial resources for specific equipment that are required by the technology; the need of support of the expertise in molecular diagnostics, because in the standardization the experience is required for the improvement of technical adjustment in according with laboratory conditions and analysts training; and finally the time taken for the adjustments in the protocols. It is hoped with these results overcome the limiting factors and that technological innovation proposal will be adopted, so businesses and consumers can be benefit with apply of analytical tools of high performance.

Keywords: Limitations. Innovation. Molecular diagnostic. PCR. Foods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de Kline-Rosenberg.....	21
Figura 2 - Métodos utilizados nas publicações sobre detecção de patógenos.....	32
Figura 3 – Número aproximado de artigos que utilizaram técnicas de detecção de patógenos nos últimos 20 anos.....	32
Figura 4 – Reação em cadeia da polimerase	34
Figura 5 – Visualização do resultado da PCR	35
Figura 6 - Procedimento realizado para amplificação de DNA.....	36
Figura 7 - DNA extraído pelo método 1 (SDS, proteinase K, CIA e etanol)	62
Figura 8 - DNA extraído pelo método 2 (lise térmica)	63
Figura 9 - DNA extraído pelo método 3 (CTAB, proteinase K, CIA, isopropanol e etanol)	64
Figura 10 - DNA extraído pelo método 4 (CIA e etanol)	65
Figura 11 - DNA extraído pelo método 5 (STE, proteinase K, lizosima, CIA, acetato de amônio e isopropanol).....	65
Figura 12 - Amplificação do gene <i>coa</i> com gradiente de temperatura	69
Figura 13 - Amplificação do gene <i>coa</i> com diferentes concentrações de MgCl ₂	70
Figura 14 - Amplificação do gene <i>nuc A</i> com gradiente de temperatura.....	71
Figura 15 - Amplificação do gene <i>coa</i> em amostras alimentícias.....	73
Figura 16 - Amplificação do gene <i>nuc A</i> em amostras alimentícias	74
Figura 17 - Visualização da amplificação dos genes <i>coa</i> e <i>nuc A</i> em amostras alimentícias	75
Figura 18 - Duplex PCR	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Comparação das condições para PCR por diferentes autores	38
Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	46
Quadro 3 – Atividade das empresas selecionadas	51
Quadro 4 - Características dos métodos de extração de DNA utilizados.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração dos componentes da PCR realizada para cada gene	47
Tabela 2 – Composição da reação Duplex PCR com variação de MgCl ₂	75

LISTA DE ABREVIATURAS

CIA	Clorofórmio:Álcool Isoamílico
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
dNTP	Desoxinucleotídeos Trifosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
mRNA	RNA mensageiro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Mg	Magnésio
qPCR	PCR em tempo real ou Quantitativa
STE	Tampão SDS, Tris e EDTA
TBE	Tampão Tris, EDTA e Ácido Bórico
TE	Tampão Tris e EDTA

LISTA DE SIGLAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BAM	Bacteriological Analytical Manual
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTA	Doença Transmitida por Alimento
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
FDA	Food and Drug Administration
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FSIS	Food Safety and Inspection Service
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-ELISA	PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REP-PCR	Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAMPL	Selective Amplification of Microsatellite Polimorphic Loci
SAW	Surface Acoustic Wave
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SSR-PCR	Simple Sequence Repeat-Anchored PCR
TC	Tampão de Carregamento
USDA	United States Department of Agriculture
VNC	Viável Não Cultivável

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo geral	15
1.1.2 Objetivos específicos	15
1.2 DELIMITAÇÃO DA PESQUISA	16
1.3 JUSTIFICATIVA	16
1.4 ESTRUTURA DA PESQUISA	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NA AGROINDÚSTRIA	20
2.1.1 Limitações à adoção de inovação tecnológica	23
2.2 DEMANDA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS	25
2.2.1 Métodos convencionais aplicados no controle microbiológico de alimentos	26
2.2.2 Métodos recentes aplicados no controle microbiológico de alimentos	27
2.2.3 Perspectivas quanto às inovações em análise microbiológica de alimentos	31
2.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PATÓGENOS ALIMENTARES VIA AMPLIFICAÇÃO DE DNA COMO INOVAÇÃO TECNOLÓGICA	33
2.3.1 Fundamentos da técnica	34
2.3.2 Padronização de protocolos	36
2.3.3 Possíveis limitantes à adoção de diagnóstico molecular	39
3 METODOLOGIA	41
3.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA	41
3.2 PERFIL DAS EMPRESAS DE BASE AGROALIMENTAR EM ESTUDO	42
3.3 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS NAS EMPRESAS	42
3.3.1 Elaboração e avaliação do instrumento de coleta de dados	42
3.3.2 Aplicação do questionário	44
3.4 ETAPAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR 44	
3.4.1 Amostras	44
3.4.2 Isolamento de DNA	45
3.4.3 Verificação da qualidade do DNA extraído	46
3.4.4 Condições de amplificação do DNA	46
3.4.5 Avaliação da amplificação	47
3.4.6 Diagnóstico molecular para detecção de <i>S. aureus</i> em amostra alimentícia	48
3.5 MAPEAMENTO DE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES	49
3.6 ANÁLISE DOS DADOS	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	50

4.2 LIMITANTES À ADOÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NAS EMPRESAS	50
4.2.1 Posicionamento empresarial frente à adoção de técnicas moleculares.....	50
4.2.1.1 Rotina laboratorial nas empresas.....	52
4.2.1.2 Falta de conhecimento dos gestores	55
4.2.1.3 Desenvolvimento de recursos humanos em diagnóstico molecular.....	56
4.2.1.4 Recursos financeiros como condicionante a inovação.....	57
4.2.1.5 Percepção dos gestores em relação às técnicas moleculares.....	58
4.2.1.6 Elementos do processo inovativo.....	59
4.3 FASES DO DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA MOLECULAR.....	61
4.3.1 Etapa de isolamento de DNA.....	62
4.3.2 Amplificação de DNA e suas dificuldades.....	68
4.3.3 Validação do diagnóstico molecular em matriz alimentícia.....	72
4.3.4 Comparação entre diagnóstico via PCR e microbiologia convencional aplicados na detecção de patógenos alimentares.....	77
4.4 APLICAÇÕES DE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA.....	79
5 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE A – Questionário de pesquisa.....	97
ANEXO A – Métodos de extração de DNA.....	102

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) representam uma ameaça para a saúde pública e também para a economia. Os programas de controle de qualidade de alimentos são empregados em todas as etapas da cadeia de produção alimentar para minimizar ou eliminar os riscos de infecções e intoxicações.

Tais programas de controle de qualidade de alimentos contam com técnicas de detecção de patógenos. As técnicas tradicionais ou convencionais de microbiologia fundamentam-se no cultivo em meios seletivos e não-seletivos e num conjunto de testes bioquímicos, sorológicos e morfológicos.

Essas técnicas são de extrema importância para determinar a inocuidade dos alimentos, mas apresentam importantes desvantagens como longo tempo de análise (dias), alto custo de implementação, alto risco de interpretação errônea, não detecção do micro-organismo, cujas características podem não ser expressas e/ou pode haver a presença de células viáveis, mas não cultiváveis (GANDRA et al., 2008).

Desta forma, surge a necessidade de alternativas às técnicas tradicionais. Neste cenário, as técnicas moleculares representam uma inovação tecnológica de importância, devido à alta sensibilidade e especificidade, além da facilidade de execução, do menor custo de reagentes e da rapidez no diagnóstico (de cinco a 24 horas dependendo da variação da técnica), o que representa um elevado ganho de tempo, comparadas aos métodos convencionais para um mesmo patógeno.

Abreu (2007) ressalta que o uso de técnicas, tecnologias e processos inovadores nas indústrias alimentícias é indispensável para oferecer produtos que os consumidores desejam, mas principalmente para aumentar a qualidade no que diz respeito à garantia da segurança alimentar durante a produção e no produto final e para a redução de custos.

A redução de custos é sempre esperada. Contudo, a garantia de resultados confiáveis é indispensável. Nas últimas décadas, houve um impulso das técnicas moleculares em função da elevada confiabilidade. A reação em cadeia da polimerase (PCR), por exemplo, foi a técnica que mais cresceu em pesquisas científicas sobre detecção de patógenos nas últimas três décadas segundo Lazcka et al. (2007).

Além disso, as técnicas moleculares representam elevação da qualidade dos laudos microbiológicos, proporcionando mais segurança à saúde pública. Porém, a adoção desta inovação do setor biotecnológico ainda é pouco observada devido às limitações encontradas pelos laboratórios. Entre os obstáculos estão a presença de inibidores da enzima polimerase, o alto investimento e a falta de padronização e regulamentação por órgãos oficiais (GANDRA et al., 2008; OLSEN, 2000).

Assim questiona-se: *“Quais fatores estão limitando a adoção das técnicas moleculares para detecção de patógenos, principalmente a PCR, nos laboratórios de microbiologia de alimentos?”*.

Com a proposição de respostas a esta questão pode-se indicar os fatores de relevância e assim discutir medidas para que a inserção das técnicas moleculares seja efetiva no setor agroindustrial, visando otimizar os esforços de controle, fornecendo maior credibilidade às empresas envolvidas. O estudo aprofundado dos fatores limitantes permitirá também diagnosticar os interferentes reais à inovação no setor.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar os principais fatores limitantes da adoção de técnicas moleculares nos laboratórios de microbiologia de alimentos da região dos Campos Gerais para a detecção de patógenos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Levantar as tecnologias aplicadas e os fatores limitantes da adoção do diagnóstico molecular como inovação tecnológica nos laboratórios de microbiologia de alimentos na região dos Campos Gerais;
- Indicar os fatores limitantes inerentes à PCR como inovação tecnológica;

- Levantar as etapas necessárias para o ajuste de um diagnóstico molecular (padronização de protocolo para um patógeno de interesse alimentar);
- Mapear os tipos de diagnóstico molecular aplicáveis na indústria alimentícia;
- Validar a aplicação de diagnóstico via PCR em matriz alimentícia utilizando protocolo padronizado.

1.2 DELIMITAÇÃO DA PESQUISA

Esta pesquisa refere-se aos limitantes encontrados para a adoção de inovação tecnológica, neste caso, na inserção do diagnóstico molecular nas empresas do ramo alimentício. Assim, limitantes de ordem organizacional e de ordem técnica são explorados.

Foram selecionadas empresas da região dos Campos Gerais, pois a região apresenta grandes e pequenas empresas do setor. No laboratório de Bioengenharia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa foram realizadas as etapas práticas para o estudo, com o apoio do Laboratório de Microbiologia do mesmo Campus.

1.3 JUSTIFICATIVA

O mercado de alimentos exige cada vez mais um controle microbiológico rigoroso. O diagnóstico microbiológico convencional de agentes patogênicos em amostras de alimentos é demorado e difícil em certos casos, com várias etapas morosas.

Como exemplo, para o patógeno *Staphylococcus aureus*, considerado um dos principais causadores de toxinfecções (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2012), é realizado o cultivo em meio seletivo, bem como provas bioquímicas (prova da coagulase, teste da catalase e prova da termonuclease) e verificação morfológica das células (MATTOS, 2005; BRASIL, 2003). O conjunto de testes é aplicado a fim de que não haja emissão de resultados duvidosos ou interpretações errôneas, mas conseqüentemente ocorre o aumento dos custos e do

tempo de análise (GANDRA et al., 2008). Ainda, há subjetividade e variação nos testes indicados para a detecção deste patógeno, fato preocupante devido a estabilidade do mesmo e das toxinas produzidas (SILVA et al., 2000; VIEIRA-DA-MOTA et al., 2001; BRASIL, 2003), pois o gene responsável por determinada característica pode estar presente, mas não estar a expressando. Em função disso, uma opção promissora é o desenvolvimento de metodologias que facilitem o diagnóstico.

A fim de eliminar ou reduzir os inconvenientes do diagnóstico convencional, métodos alternativos são desenvolvidos para que os tradicionais sejam substituídos ou complementados, como técnicas de imunoensaio, de imunodifusão, de hibridização, entre outras, que permitem elaborar um diagnóstico com alto grau de confiabilidade. Dentre as alternativas destacam-se as técnicas da biologia molecular, sendo a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a mais explorada (ANDRADE et al., 2010; FORSYTHE, 2002).

A PCR é altamente específica e sensível para detectar pequenas quantidades de DNA alvo, sendo o mais avançado método para diagnóstico de patógenos em alimentos, com precisão nos resultados por apresentar maior sensibilidade em relação aos métodos convencionais. Para obtenção de resultados ainda mais específicos, pode ser usada em conjunto com os métodos tradicionais não moleculares (LAZCKA et al., 2007; GANDRA et al., 2008; FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006).

Assim, pode-se dizer que a PCR é uma alternativa viável às técnicas tradicionais ou pode ser utilizada como complemento a estas, mas ainda é pouco empregada nos laboratórios de microbiologia de alimentos (GANDRA et al., 2008; OLSEN, 2000).

Em países desenvolvidos, o diagnóstico molecular já está inserido na rotina dos laboratórios industriais, como também nas linhas de produção, por meio da *real time PCR* (qPCR), demonstrando ser uma ferramenta de alto desempenho na triagem de micro-organismos devido às suas características, principalmente à sua sensibilidade (GE; MENG, 2009; ARORA; CHAND; MALHOTRA, 2006).

Alguns países, como os Estados Unidos, desenvolvem e validam seus métodos moleculares para a triagem e identificação de patógenos para uso interno por meio das agências reguladoras incluindo a *Food and Drug Administration* (FDA)

(GE; MENG, 2009). Contudo, no Brasil este processo de desenvolvimento e validação ainda é lento.

As pesquisas consultadas descrevem as vantagens e desvantagens das técnicas, mas não indicam de maneira direta, nem caracterizam fatores que dificultam a adoção da técnica molecular nos laboratórios de microbiologia de alimentos inseridos em indústrias. Desta forma, caracterizar os fatores limitantes, indicando os principais para a incorporação de diagnóstico molecular no controle de qualidade de alimentos, torna-se uma pesquisa de importância, visto que as técnicas moleculares vêm ao encontro das necessidades da indústria como a redução de custos (reagentes, meios de cultura, mão de obra e equipamentos) e de tempo, bem como representa a evolução das análises de alimentos no controle de processo produtivo.

1.4 ESTRUTURA DA PESQUISA

A presente pesquisa se divide em cinco sessões. O primeiro traz a contextualização e apresentação do tema, o problema, os objetivos, a delimitação e justificativa da pesquisa, demonstrando a necessidade da realização da mesma.

O segundo capítulo apresenta o embasamento teórico, tratando sobre a inovação tecnológica na agroindústria, as limitações à adoção de inovações, a demanda de inovações no controle de qualidade de alimentos com o foco na análise microbiológica de alimentos. Assim, envolve métodos microbiológicos convencionais e recentes aplicados no controle microbiológico de alimentos, indicando as perspectivas de inovações na área. Em seguida, há a descrição do diagnóstico molecular como inovação, com a descrição de diversos autores sobre os fundamentos da técnica PCR, sua padronização ou adaptação de protocolos, finalizando com possíveis limitantes à adoção do diagnóstico molecular.

No terceiro capítulo estão apresentadas as etapas para a condução da pesquisa, a metodologia, de forma detalhada para que possa ser compreendida e reproduzida, desde a elaboração do questionário para a pesquisa junto às empresas até a condução do experimento do diagnóstico molecular.

O quarto capítulo apresenta os resultados alcançados bem como a discussão dos mesmos, com a subdivisão necessária. Também, há a descrição das

implicações dos procedimentos obtidos com a realidade das empresas do setor alimentício e considerações do uso de diagnóstico molecular em relação às técnicas convencionais na detecção de patógenos alimentares.

O último capítulo traz as conclusões da pesquisa apontando os principais limitantes da adoção de diagnóstico molecular, além de perspectivas e potencialidades.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NA AGROINDÚSTRIA

A agroindústria brasileira e o mercado agroindustrial têm atraído novos investimentos, com crescimento no ano de 2010 de 4,7%, revertendo a queda de 4,8% do ano de 2009. O volume exportado dos principais produtos da agroindústria apresentou variações positivas em relação a 2009 como: a carne de aves não cortada em pedaços (+6,4%), pedaços e miudezas de aves (+5,7%), carnes de bovinos congeladas (+2,2%), celulose (+1,7%), açúcar (+15,3%), grãos de soja triturados (+1,8%), bagaços e outros resíduos da extração do óleo de soja (+11,0%) e óleo de soja bruto (+2,2%) (CRIBB, 2009; IBGE, 2011).

Com o crescimento, a expansão e a inserção em novos mercados estão sendo estabelecidas e as empresas do ramo estão reconhecendo que para obter crescimento econômico há a necessidade do uso e desenvolvimento de novas tecnologias e novos produtos agroindustriais (CRIBB, 2009).

Tal necessidade é ocasionada muitas vezes pela mudança no estilo de vida dos consumidores que traz novos paradigmas para o setor, como diferenciação de produtos por meio de aspectos qualitativos. Desta forma, caracteriza-se uma dimensão que pode ser alcançada por meio da inovação de produto ou de processo. As inovações tornam-se, portanto, imprescindíveis para a sobrevivência das empresas agroalimentares brasileiras, devido ao alto nível da concorrência internacional (ABREU, 2007; SENAI, 2007).

No Manual de Oslo, inovação é a implementação de um produto, processo ou método novo ou significativamente melhorado, sendo o requisito mínimo para definir uma inovação é que o processo, produto ou método sejam novos para a empresa (OCDE, 2005).

Vale mostrar o modelo de Kline e Rosenberg (Figura 1), que apresenta a sequência principal da inovação representada pela letra S, que se inicia com a invenção ou reordenamento de conhecimentos, seguindo para projetos, revisão de projetos, produção, lançamento no mercado com marketing e distribuição.

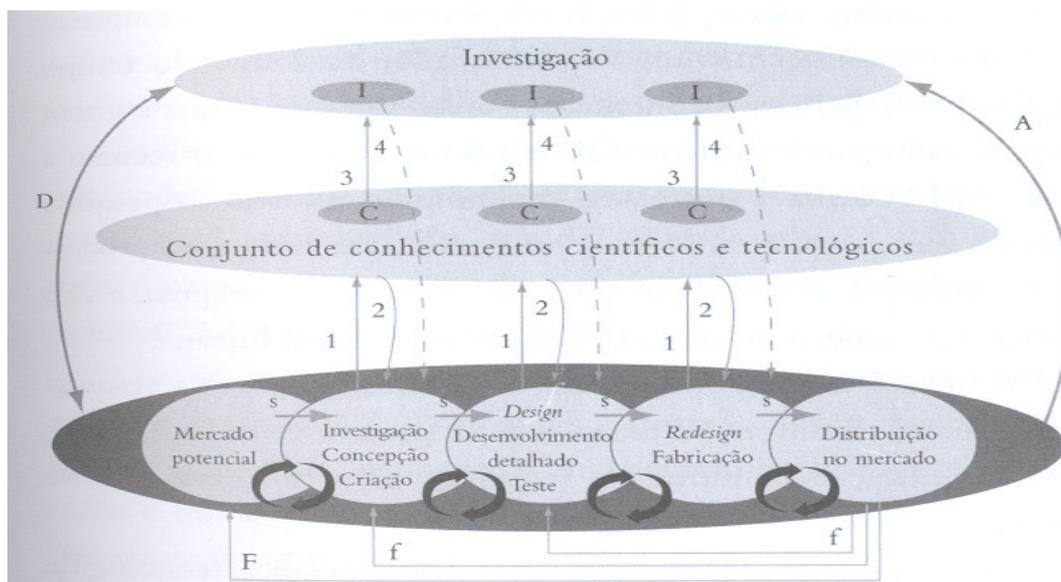


Figura 1 - Modelo de Kline-Rosenberg
Fonte: Kline e Rosenberg (1986) citados por Reis (2008)

Quanto aos tipos de inovações, as de produto e processo apresentam maior ocorrência no setor agroalimentar. As inovações de produtos na indústria de alimentos ocorrem principalmente no *design* das embalagens e na composição do produto, principalmente em relação à adição de novos aditivos, ou seja, adaptações para atender as necessidades dos consumidores. Já, as inovações de processo na indústria de alimentos são frequentemente incrementais, como adaptações em máquinas e em equipamentos (ABREU, 2007). Na presente pesquisa a inovação proposta é uma inovação de processo.

Essas inovações são adotadas na agroindústria ou em outros segmentos industriais a fim de obter vantagem competitiva, embora a inovação dentro das empresas possa estar em conflito com as atividades de qualidade, sendo assim não aceitas (LOPES-MIELGOA; MONTES-PIONB; VAZQUEZ-ORDÁSB, 2009).

Entretanto, a pesquisa realizada por López-Mielgoa et al. (2008) citados por Lopes-Mielgoa, Montes-Pionb e Vazquez-Ordásb (2009) mostrou que os fatores relacionados com tecnologia e inovação aumentam a probabilidade da adoção de práticas de controle de qualidade e normalização em empresas do setor de alimentos e bebidas.

Abreu (2007) argumenta ainda que as inovações tecnológicas na indústria de alimentos estão voltadas, principalmente, no aumento de produtividade, na

agregação de valor ao produto e na redução de custos. Ainda, para atender essas prioridades investimentos em equipamentos e programações são necessários, assim como maior assepsia nas linhas de produção reduzindo de forma significativa a contaminação.

Grande parte das inovações, independente de seu tipo, está em consonância com os interesses das empresas multinacionais e as tecnologias adotadas geralmente são desenvolvidas em países onde a realidade econômica é diferente. Essas tecnologias podem não estar de acordo com os interesses, recursos disponíveis, necessidades específicas e com a mão de obra brasileira. A falta de assistência especializada pode ser um problema à inovação tecnológica. Assim, a inovação tecnológica está diretamente ligada à dinâmica do setor, à concorrência, à extensão geográfica de atuação, ao porte, a capacidade financeira e às necessidades internas (ABREU, 2007; MAÑAS, 2001; TIGRE, 2006).

Vale destacar que o processo de inovação tecnológica na indústria de alimentos acontece em maioria por difusão tecnológica. As empresas do setor apresentam um padrão de inovação voltado à redução de custos, associado à difusão de tecnologias já existentes (ABREU, 2007).

Outro aspecto relevante ao que se refere a inovar é a estratégia tecnológica adotada. Mas, não existem fórmulas prontas, sendo poucas as empresas que desenvolvem estratégias. As estratégias das empresas, em termos de inovação, dependem de elementos que configuram as estruturas de mercado e padrões de concorrência, além de fatores relativos ao ambiente nacional e às políticas públicas (REIS, 2008).

Neste caso, grande parte das empresas nacionais utiliza a tecnologia de base (essenciais para a produção de um determinado produto), o que evidencia baixa capacidade de inovação, enquanto as empresas multinacionais utilizam as tecnologias-chave (tecnologias que proporcionam vantagem competitiva por meio da maior eficiência, produtividade e qualidade) e emergentes (tecnologias que podem provocar mudanças radicais) geralmente desenvolvidas em seus países de origem (ABREU, 2007). Isso ressalta o fato das empresas nacionais estarem de certa forma, dependentes do desenvolvimento tecnológico das multinacionais.

Em resumo, a agroindústria inova para satisfazer os clientes e as exigências de qualidade, a fim de cumprir a regulamentação nacional e internacional, superar

as barreiras técnicas ao comércio, obter vantagem competitiva e/ou para obter a certificação. Adicionalmente, visa atender aos novos e sofisticados mercados o que exige o desenvolvimento de novas tecnologias de produto e processo, a maioria proveniente de organizações externas, fornecedores, instituições públicas de pesquisa e desenvolvimento ou de outros setores (biotecnologia, eletrônica, informática, química, entre outros) (LOPES-MIELGOA; MONTES-PIONB; VAZQUEZ-ORDÁSB, 2009; RÉVILLION et al., 2004).

A absorção de tecnologias, técnicas, produtos e processos pode ser dificultada por diversos fatores. As limitações à inovação tecnológica são explanadas a seguir.

2.1.1 Limitações à adoção de inovação tecnológica

Antes de apresentar as limitações à adoção de inovações, é indispensável reforçar o conceito de difusão tecnológica.

A difusão tecnológica pode ser entendida como o processo pelo qual a inovação é comunicada ou a aplicação em escala progressiva da inovação (TIGRE, 2006; BATALHA et al., 2008).

A difusão pode revelar problemas que podem ser corrigidos em novas versões. Desta maneira, a difusão alimenta e redireciona a trajetória da inovação, revelando as necessidades de demanda por soluções técnicas, ou seja, molda a inovação para as condições de uso. Enquanto o processo de difusão tecnológica é a trajetória de adoção de uma tecnologia no mercado, este processo pode ser analisado a partir da direção ou trajetória tecnológica, ritmo ou velocidade de difusão, fatores condicionantes e impactos econômicos (TIGRE, 2006; BATALHA et al., 2008).

No caso da presente pesquisa os fatores condicionantes citados por Tigre (2006), serão explorados, sendo de ordem técnica, institucional e econômica.

No Manual de Oslo (OCDE, 2005) esses são colocados como fatores que influenciam a inovação, dispostos em econômicos, específicos à empresa e legais. Como exemplos, dentre estes podem-se citar, respectivamente, custos elevados e

deficiências de demanda, carência de pessoal especializado ou de conhecimentos, regulações e regras tributárias.

Dentro de condicionantes técnicos mencionados por Tigre (2006) está a disponibilidade de suporte técnico, no que diz respeito à flexibilidade organizacional e a capacidade cognitiva para reter novos conhecimentos, solucionando problemas na introdução, otimização e adaptação de tecnologias.

Assim, o sucesso da introdução de uma nova tecnologia depende diretamente da aplicação e do uso das informações, da implementação de mudanças (incorporação de novos procedimentos, rotinas e informações) e retreinamento de recursos humanos (TIGRE, 2006).

Nos condicionantes econômicos, incluem-se os custos de aquisição, implantação e manutenção da nova tecnologia, além do retorno do investimento. Entre os condicionantes institucionais, estão a disponibilidade de financiamentos, os incentivos fiscais, o clima favorável ao investimento, os acordos internacionais de comércio, o sistema de propriedade intelectual, as questões sociais, culturais e religiosas, o regime jurídico do setor ou do país e a existência de capital humano e instituições de apoio (TIGRE, 2006).

O fator ou condicionante econômico pode, por exemplo, ser solucionado com o auxílio das fontes de financiamento e fomento. No Brasil, as fontes de incentivo à inovação se distribuem em fomento à capacitação de recursos humanos, incentivos fiscais, incentivos tributários e financiamentos (reembolsáveis e não reembolsáveis), dentro de fontes públicas. As fontes privadas ainda não estão em destaque (LABIAK JR; MATOS; LIMA, 2011).

Os editais públicos são os principais responsáveis na divulgação das oportunidades de fomento. Há uma seleção de projetos para que recebam recursos públicos, tais editais e seleções são desenvolvidos por agências governamentais e entidades como, Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), entre outras (LABIAK JR; MATOS; LIMA, 2011).

Assim, na adoção de inovação uma análise das variáveis (fatores) que envolvem o processo de adoção deve ser realizada, com abrangência dos fatores

financeiros, sociais e ambientais e as possibilidades de retorno do investimento (ABREU, 2007).

Almeida (2010) relaciona fatores condicionantes como barreiras à inovação. Neste contexto, a ausência de capacitação técnica interna, a ausência de profissionais qualificados no mercado, as falhas e riscos de mercado, os procedimentos burocráticos e a falta de recursos financeiros representam os principais empecilhos à inovação.

Assim, o setor agroindustrial deve analisar esses limitantes e/ou barreiras para inovar, principalmente no que diz respeito às inovações voltadas à qualidade. Ressaltando que este requisito ganhou nova dimensão, que pode ser alcançada com inovação tecnológica de produto e de processo (ABREU, 2007).

2.2 DEMANDA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS

Entre os parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, os mais importantes são aqueles que definem suas características microbiológicas. A avaliação da qualidade microbiológica de um produto fornece diversas informações, principalmente quanto ao risco para a saúde da população (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

A segurança alimentar é considerada um importante tema para a saúde pública, sendo prioridade da agenda política de muitos países. Países desenvolvidos e em desenvolvimento são alvos de estatísticas dramáticas que indicam o número de vítimas acometidas por doenças transmitidas por alimentos (DTA's) contaminados. Assim, há grande sensibilização por parte dos consumidores quanto às exigências de qualidade e segurança alimentar (FERREIRA, 2008; CESCO, 2010; MALDONADO, 2008).

A fim de prevenir DTA's e garantir a qualidade do alimento produzido, o setor de controle de qualidade das empresas utiliza ferramentas capazes de interromper um processo em desacordo com as especificações. A utilização de métodos de detecção de micro-organismos em alimentos é uma das maneiras utilizadas para garantir a qualidade dos produtos (MALDONADO, 2008; ANDERSEN, 2007).

Portanto, a verificação da ausência ou presença de micro-organismos patogênicos em alimentos é indispensável, sendo essenciais métodos de detecção robustos e confiáveis, para garantir alimento próprio para o consumo.

Os métodos convencionais são consagrados na análise microbiológica de alimentos, porém, baseados em protocolos demorados, que necessitam de dias para emissão de resultados conclusivos, além da elevada quantidade de reagentes e vidrarias. Neste sentido, o diagnóstico é confiável, mas pouco prático e eficiente, principalmente quando se trata de inspeção sanitária, onde os resultados devem ser rápidos e seguros para a liberação de lotes de alimentos (RÜCKERT, 2006).

Forsythe (2002) afirma que os métodos de detecção usuais podem não estar recuperando todos os patógenos em alimentos e água e que métodos alternativos precisam ser desenvolvidos, como os de imunologia e de sequências de DNA.

Desta forma, a seguir são apresentadas as técnicas convencionais e as técnicas recentes empregadas no controle microbiológico de alimentos.

2.2.1 Métodos convencionais aplicados no controle microbiológico de alimentos

Para o controle microbiológico de alimentos são aplicadas diversas técnicas. No entanto, as mais empregadas são as técnicas microbiológicas convencionais, reconhecidas mundialmente como métodos padrão de detecção de patógenos em alimentos, também chamados “padrão ouro”. Tais métodos, em teoria, são capazes de identificar células viáveis em amostras de alimentos seguindo os estágios de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo (RÜCKERT, 2006; GE; MENG, 2009).

De maneira geral, os métodos convencionais de microbiologia de alimentos tem como base a microbiologia clássica que se fundamenta, por exemplo, para detecção de uma determinada bactéria em pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento do micro-organismo alvo em meio de cultura apropriado e na confirmação por meio de testes sorológicos, bioquímicos e morfológicos (GANDRA et al., 2008; LI et al., 2009; BENETTI, 2009; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012).

Os resultados dos testes bioquímicos podem conduzir o analista a erros, pois sofrem variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica,

o que acarreta resultados distintos. Outras características relevantes são o baixo poder discriminatório em micro-organismos com baixa variabilidade genética e o limitado número de testes devido aos custos dos mesmos (GANDRA et al., 2008).

O tempo gasto para a obtenção dos resultados é uma desvantagem muito discutida, pois determinadas análises demandam de vários dias para a obtenção de resultados conclusivos. Apesar dos progressos na formulação de meios de cultura seletivos a detecção continua demorada e trabalhosa (GE; MENG, 2009).

Andrade (2008), ao desenvolver uma pesquisa, relata que o maior inconveniente foi o tempo necessário para isolar a *Listeria monocytogenes* e o custo dos meios de cultura recomendados no método.

O custo dos métodos convencionais é alto comparados a outros. Teodoro et al. (2006) calcularam os custos do material de consumo da análise convencional e da PCR para a detecção do mesmo micro-organismo e na mesma matriz alimentar e concluíram que a PCR foi mais econômica.

No entanto, a não detecção de células viáveis não cultiváveis é a desvantagem mais representativa, visto que o método convencional baseia-se na cultura do micro-organismo alvo. Segundo Gandra et al. (2008), as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas e quando isso acontece são de difícil interpretação e classificação.

É importante destacar que diversas bactérias patogênicas em condições adversas podem sofrer injúria sub-letal, o que pode inibir a multiplicação nos meios de cultura empregados. As VNC (células viáveis não cultiváveis) representam um perigo à saúde pública, visto que, podem estar presentes e alimentos podem ser liberados pela não detecção de patógeno (MAZIERO, 2007; FORSYTHE, 2002).

O fenômeno VNC já foi observado em *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* (FORSYTHE, 2002). Assim, técnicas são desenvolvidas para que haja maior segurança na produção de alimentos, suprimindo estas e outras dificuldades.

2.2.2 Métodos recentes aplicados no controle microbiológico de alimentos

Dentre os métodos contemporâneos têm-se a citometria de fluxo, kits de imunodiagnóstico, imunomagnética, reação em cadeia da polimerase (PCR), condutância e espectrometria. Esses métodos têm sido aplicados em uma ampla variedade de matrizes alimentícias. No entanto, a ampla aplicação no monitoramento em tempo real ainda é pouco observada, embora representem uma vantagem competitiva (ARORA; CHAND; MALHOTRA, 2006; IVNITSKI et al., 1999; ALCOCER; OLIVEIRA, 2003).

A citometria de fluxo consiste na medição de características das células quando suspensas em meio fluido, informações como tamanho, números, características da parede celular e número de organelas são fornecidas. Essa técnica é aplicada, por exemplo, para contagem de células bacterianas em leite, sendo que o equipamento expressa o número de células por mL, representando a contagem individual de bactérias (CASSOLI, 2005).

Já, o método imunomagnético auxilia na separação das células alvo por meio de microesferas que promovem a captura das células por ligações imunológicas e a separação por forças magnéticas, não dispensando as etapas de enriquecimento, isolamento e provas bioquímicas e sorológicas (BRASIL, 2003).

Os ensaios imunoenzimáticos baseados nas técnicas de triagem contribuem para simplificar a detecção de patógenos em alimentos. Nestes ensaios, reações antígeno-anticorpo empregam anticorpos marcados com uma enzima cromogênica facilitadas por leitores automatizados. A especificidade do método está atrelada à ligação antígeno com o anticorpo. Entre os testes imunoenzimáticos existentes, o teste tipo sanduíche é o mais empregado (BENETTI, 2009; RUCKERT, 2006).

Todos os sistemas de ensaio imunoenzimático disponíveis para análise até o momento são heterogêneos, nos quais os patógenos investigados são capturados por aglutinação através de anticorpos específicos adsorvidos à superfície de uma matriz sólida. Em seguida, o complexo antígeno-anticorpo reage com o conjugado preparado, por meio da ligação do anticorpo específico para o micro-organismo a ser detectado e com uma enzima cromogênica. Após determinado período, o conjugado não ligado presente é lavado e uma substância é adicionada. O sanduíche formado reage com o substrato da enzima cromogênica, resultando no desenvolvimento de cor. Substratos fluorogênicos também podem ser empregados. Se a enzima está presente, o substrato será modificado, resultando em um produto que pode ser detectado (BENETTI, 2009).

Imunossensores também se destacam na detecção de micro-organismos. Os biossensores se destacam na área de detecção, pois convertem a análise biológica em um sinal elétrico como resposta. Um elemento biológico produz um sinal baseado em eletroquímica, ótica ou energia térmica proporcional à concentração dos analitos e/ou de acordo com outros parâmetros de interesse biológico. O sensor apresenta um elemento bioativo (enzima, anticorpo, ácido nucléico, peptídeo, entre outros) que conduz à afinidade com o analito de interesse. Os biossensores são utilizados principalmente quando se tratam de compostos ou micro-organismos de difícil detecção (ARORA; CHAND; MALHOTRA, 2006).

Arora et al. (2011) citam os biossensores como ferramentas inovadoras na detecção de patógenos alimentares, englobando conceitos dos métodos contemporâneos. Entre os diversos biossensores podem ser citados os ópticos, amperométricos, potenciométricos, condutimétricos, termométricos, piezoelétricos, imunossensores, baseados em DNA, baseados no metabolismo microbiano, entre outros (FURTADO et al., 2008).

A PCR ganhou destaque a partir da década de 90, sendo que esta técnica fundamentou os biossensores baseados em DNA. Variantes da técnica surgiram, entre elas as mais conhecidas são a [1] qPCR (*real time PCR*) é baseada na detecção pela emissão fluorescente de corante específico associado ao *amplicon* alvo com a intensidade da fluorescência proporcional a soma do produto amplificado; a [2] multiplex PCR, muito útil por permitir a detecção simultânea de vários organismos ou vários genes associados à virulência de um mesmo organismo introduzindo diferentes oligonucleotídeos iniciadores para amplificar regiões específicas do DNA; e a [3] *reverse transcriptase PCR* desenvolvida para detectar somente células viáveis (LASCKA et al., 2007; POSTOLLEC et al., 2011; ROCHA, 2008; ZOCHE et al., 2011).

Podem ainda ser citadas a *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), *simple sequence repeat-anchored PCR* (SSR-PCR), *selective amplification of microsatellite polymorphic loci* (SAMPL), *pulse field gel electrophoresis* (PFGE), *repetitive extragenic palindromic* (REP-PCR), *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC-PCR) e *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) (CORTEZ, 2006; ARORA; CHAND; MALHOTRA, 2006; LAZCKA et al., 2007; ROCHA, 2008; CARVALHO, 2009).

Essas técnicas fundamentadas em PCR vêm sendo cada vez mais empregadas na identificação de vários micro-organismos em alimentos, principalmente bactérias. Já são utilizadas com êxito, por exemplo, na detecção de *L. monocytogenes*, *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *B. cereus*, entre outros (ANDRADE, 2008; MÁCHIW; POPOWSKI; SZPONAR, 2008; TEODORO et al., 2006; PASSO, 2009; GARCIA et al., 2008; CORTEZ, 2006; ARRUDA, 2006; SINGH et al., 2011; SUBRAMANIAN et al., 2006; BARDON et al., 2011).

Também existem métodos avançados combinados com PCR como, por exemplo, *surface acoustic wave sensor* (SAW) ou *evanescent wave sensor* e PCR-ELISA (PCR-*enzyme-linked immunosorbent assay*) (LASCKA et al., 2007).

A nanotecnologia já está sendo aliada à PCR, sendo que a técnica denominada micro-PCR opera 40 ciclos em menos de 6 minutos, reduzindo ainda mais o tempo da análise, técnica ainda em desenvolvimento (GE; MENG, 2009; LEE et al., 2003).

A condutância/impedância fundamenta-se nas medidas das mudanças de impedância e condutância elétrica num meio de cultivo como resposta à multiplicação dos micro-organismos (DRAGONE et al., 2007). As mudanças ocorrem no meio devido à atividade metabólica dos micro-organismos.

A espectrometria de massas é muito utilizada na biologia e nos últimos anos tornou-se disponível para o uso na microbiologia. É utilizada no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas, baseando-se nas propriedades físicas (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

Pode-se perceber que os avanços em biotecnologia têm alavancado as técnicas de detecção de micro-organismos e influenciado o desenvolvimento de técnicas cada vez mais rápidas, automatizadas e sofisticadas. Entretanto, métodos rápidos são geralmente utilizados como técnicas de triagem, ou seja, resultados positivos requerem confirmação por método oficial adequado (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012).

2.2.3 Perspectivas quanto às inovações em análise microbiológica de alimentos

Uma forte motivação para a indústria do setor alimentício desenvolver testes rápidos é o avanço da biotecnologia e da nanotecnologia, pois trazem consigo a possibilidade de novas técnicas ou o melhoramento das existentes para a detecção de patógenos alimentares (ARORA; CHAND; MALHOTRA, 2006).

Nos últimos anos, o crescimento dos testes rápidos e o decaimento na utilização de testes de cultivo foram observados na indústria de alimentos (GE; MENG, 2009).

De acordo com um recente relatório da *Food Micro – 2008 to 2011* realizado pela *Strategic Consulting*, a indústria alimentar utilizou 738.300 testes microbiológicos em escala mundial, o que representa um valor superior a \$ 2 bilhões (dois bilhões de dólares), representando um aumento no volume de testes de 17,8% em relação aos três anos anteriores. Os exames de rotina representam 81,3% do total dos testes de microbiologia alimentar, sendo que os métodos convencionais representavam cerca de 60% do total de testes em alimentos em 2008 pouco abaixo de 2005 (65%). Os testes para patógenos alimentares cresceram mais rápido, em torno de 25,6% e o aumento do uso de métodos rápidos foi de 36,8% em 2005 (GE; MENG, 2009).

O aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares também foi observado nas últimas décadas. Esforços são realizados a fim de comercializar produtos baseados em DNA para a detecção de patógenos. As patentes relacionadas com a detecção de bactérias entéricas em alimentos via hibridização do DNA começaram a surgir, devido principalmente ao fato das empresas ganharem vantagem competitiva com o uso de técnicas que propiciem resposta rápida e sejam confiáveis (ARORA; CHAND; MALHOTRA, 2006).

A PCR está sendo descrita como uma ferramenta comum no controle de patógenos, mas com campo onde a progressão é possível (LASCKA et al., 2007).

Na Figura 2, é possível observar as tendências quanto ao uso das técnicas aplicadas nas pesquisas publicadas entre 1985 e 2005. Lazcka et al. (2007) mostraram o crescimento da PCR nas publicações a nível internacional, sendo possível perceber na década de 90 a consolidação da técnica.

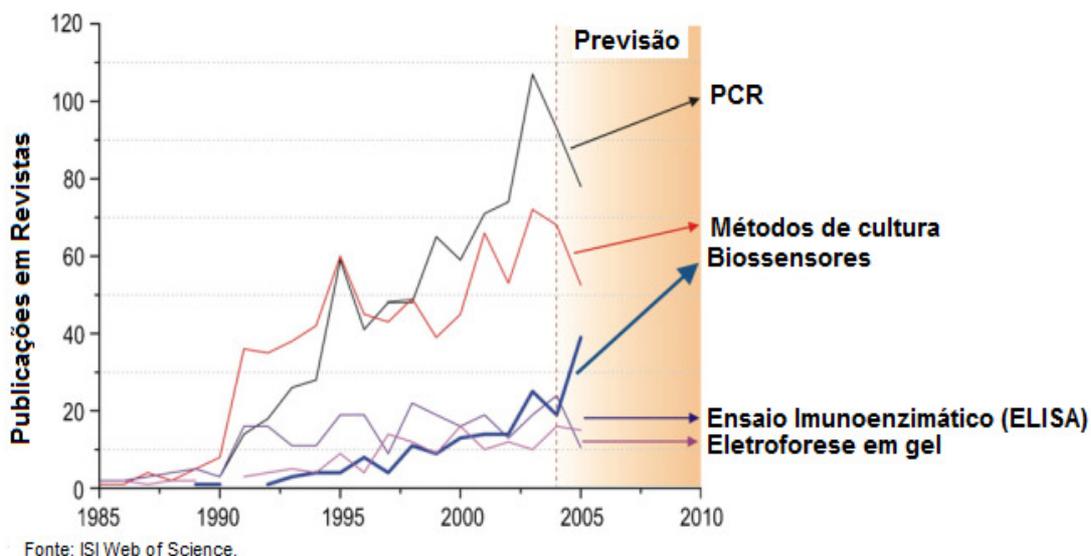
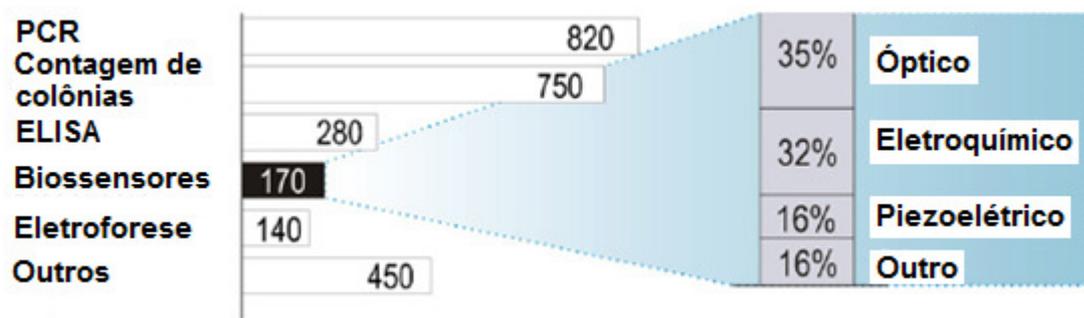


Figura 2 - Métodos utilizados nas publicações sobre detecção de patógenos
 Fonte: Adaptado de Lazcka et al., 2007

Assim, as inovações envolvendo amplificação de DNA e biossensores estão em crescimento (Figura 2 e 3), principalmente por apresentarem uma característica relevante, a de fornecer o resultado *in time*.

A Figura 3 apresenta o número aproximado de artigos que utilizaram diferentes técnicas de detecção e/ou identificação de bactérias patogênicas.



Fonte: ISI Web of Science.

Figura 3 – Número aproximado de artigos que utilizaram técnicas de detecção de patógenos nos últimos 20 anos
 Fonte: Adaptado Lazcka et al., 2007

Vale destacar a PCR como técnica complementar. Pamuk e Akgun (2009) utilizaram PCR para confirmar resultados, comum nas pesquisas científicas. Nestes casos, as técnicas convencionais são utilizadas nas etapas iniciais da pesquisa.

É possível observar que o diagnóstico molecular via amplificação de DNA (PCR) está em crescimento e conseqüentemente as inovações relacionadas serão notáveis nos próximos anos, com a valorização do limiar de detecção e tempo de análise. Sendo a PCR indicada como o ator de inovação tecnológica desta pesquisa.

Vale reforçar que a indústria deve estar atenta a esta tendência, pois pode estar elevando a credibilidade e a vantagem competitiva da empresa, pois fatores como alta confiabilidade, sensibilidade, especificidade, tempo de análise, custos, entre outros, são aspectos relevantes associados à PCR.

2.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PATÓGENOS ALIMENTARES VIA AMPLIFICAÇÃO DE DNA COMO INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

Os métodos convencionais de detecção de patógenos são os mais utilizados no controle microbiológico de alimentos dentro das indústrias. Porém, outras técnicas estão sendo estudadas e inseridas no controle de qualidade microbiológica para suprir dificuldades encontradas na utilização de métodos convencionais (ANDRADE et al., 2010).

A PCR revolucionou a análise genética, visto que as pesquisas propiciaram o desenvolvimento de diversas técnicas derivadas, já consolidadas principalmente em laboratórios experimentais como ferramenta complementar aos métodos oficiais de análise microbiológica (CORTEZ, 2006).

Na análise microbiológica de alimentos há a necessidade de procedimentos rápidos e eficazes, pois a rápida e elevada iminência de novas contaminações alimentares conduz a esta necessidade, neste contexto a PCR é promissora (PASSO, 2009).

Ressalta-se assim que os testes baseados em PCR estão entre os mais rápidos utilizados atualmente, permitindo a detecção de patógenos de relevância e reconhecidos como potenciais alternativas aos métodos de cultura (KILLNER, 2008; PASSO, 2009).

2.3.1 Fundamentos da técnica

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi idealizada por Kary Mullis e Randall Saiki na década de 1980, e a partir desta data houve uma revolução na genética molecular devido à nova abordagem que proporcionou para o estudo dos genes (RÜCKERT, 2006).

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica que permite produzir um grande número de cópias da sequência específica de DNA alvo através de uma reação enzimática, sendo necessário conhecer apenas a estrutura da região a ser amplificada e não o DNA completo. A sequência de DNA altamente específica fornece informações biológicas em todos os níveis taxonômicos, sendo ideal para a detecção específica de micro-organismos (RÜCKERT, 2006; LI et al., 2009).

Possui como princípio a capacidade da enzima polimerase (*Taq* DNA polimerase) replicar sequências de DNA, a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita réplica, denominados oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*. Estes flanqueiam a sequência que se deseja, por meio de variações alternadas e cíclicas de temperatura em termociclador. As variações de temperatura promovem a desnaturação, a hibridização e a extensão do DNA de organismos ou células, como esquematizado na Figura 4 (LAZCKA et al., 2007; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012).

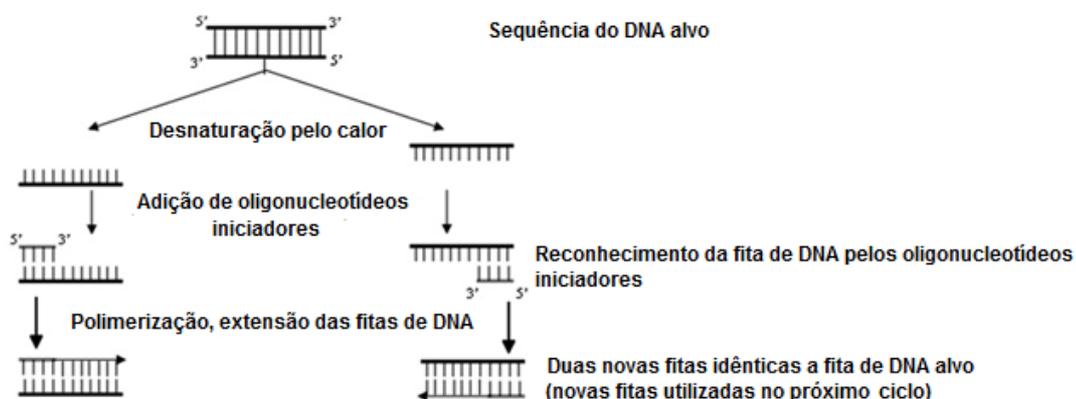


Figura 4 – Reação em cadeia da polimerase
Fonte: Adaptado de Lazcka et al., 2007

A desnaturação, a aproximadamente 95 °C, consiste na abertura da fita dupla de DNA formando fitas simples que servirão de molde para os oligonucleotídeos iniciadores e para a DNA polimerase. Na hibridização, há o abaixamento da temperatura para que ocorra o pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores com a região reconhecida, cuja temperatura de hibridização irá variar de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados. A extensão consiste na cópia da fita dupla original pela incorporação de nucleotídeos nas fitas complementares, a uma temperatura superior a temperatura de hibridização. Após a amplificação da sequência de DNA, que ocorre ciclo após ciclo (progressão geométrica), é possível realizar a visualização dos resultados na forma de banda em gel após eletroforese. Como exemplo, na Figura 5, tem-se a banda do marcador de peso molecular de referência, do controle positivo e negativo e a banda da amostra, respectivamente (CORTEZ, 2006; LAZCKA et al., 2007; RÜCKERT, 2006).

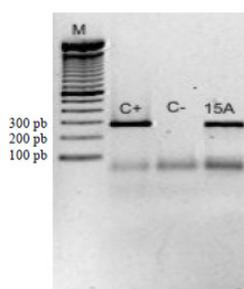


Figura 5 – Visualização do resultado da PCR

Fonte: Rückert, 2006

De uma maneira geral, a reação é realizada utilizando enzima, dNTPs, oligonucleotídeos iniciadores, DNA, PCR *buffer* e MgCl₂, os quais formam uma única solução (*Mix*), submetida a amplificação e posteriormente a eletroforese, conforme representação na Figura 6.

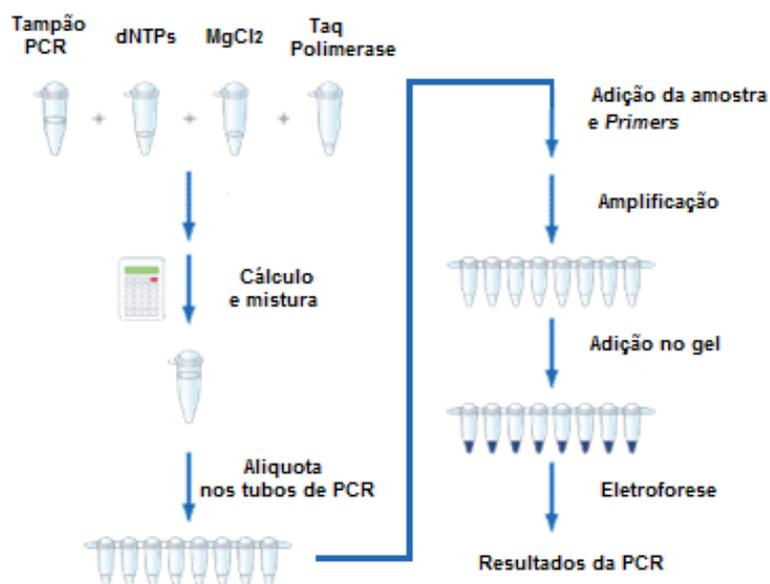


Figura 6 - Procedimento realizado para amplificação de DNA
Fonte: Adaptado de ABgene, 2012

Mas, para que a reação tenha sucesso é necessário conhecer a concentração e o volume ideal de cada um dos seus componentes, assim como, as temperaturas ideais para amplificação da sequência desejada. Essas informações são dispostas em protocolos, realizados a partir das particularidades da amostra e da reação com o objetivo de reduzir a interferência de inibidores (PASSO, 2009).

Logo, protocolos padronizados são imprescindíveis, porém a falta destes ainda é discutida entre pesquisadores (GANDRA et al., 2008; MALORNY et al., 2003; FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006).

2.3.2 Padronização de protocolos

As técnicas moleculares disponíveis atualmente estão sendo refinadas continuamente, com o intuito de padronizá-las e torná-las aplicáveis a diversas amostras (GIRONESA et al., 2010).

A falta de padronização é vista como um fator que dificulta a implantação de técnicas moleculares nos laboratórios, visto que obriga os laboratórios a despender de muitos recursos para adaptar testes. Outro fato relevante é que protocolos não padronizados são inconsistentes para os peritos e laboratórios. Logo, há um aumento da demanda de protocolos padronizados simples e confiáveis para a

análise biológicas de importância (FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006; ARORA; CHAND; MALHOTRA, 2006; GANDRA et al., 2008).

Variáveis como inibidores presentes na matriz da amostra, eficiência da enzima e desempenho do termociclador são consideradas inerentes a análise e tem dificultado a implantação de técnicas moleculares pelos laboratórios. Esses fatores também podem estar reduzindo a acurácia analítica (especificidade, sensibilidade e limite de detecção) (FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006; MALORNY et al., 2003).

Assim, na fase de padronização, devem ser estabelecidas e estudadas as condições ótimas de extração de DNA de cepas padrão, os oligonucleotídeos iniciadores, a concentração dos reagentes, o preparo das amostras e as condições de amplificação dos fragmentos baseando-se em trabalhos publicados (ATOBE, 1998; GANDRA et al., 2008; PASSO, 2009). Algumas dessas “etapas” para a padronização podem ser exploradas por meio de comparações, como demonstrado a seguir no Quadro 1 para a detecção do micro-organismo *Staphylococcus aureus*, considerando o gene *coa*.

Oligonucleotídeos Iniciadores	Gene Alvo	pb*	Condições de PCR	Temperatura de Hibridização	Referência
CGAGACCAAGATTCAACAAG AAAGAAAACCACTCACATCA	<i>Côa</i>	Aprox. 950 pb	Volume da reação 50 µL: 5 µL 10x PCR <i>buffer</i> (750 mM Tris HCl, pH 8.8, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% Tween 20), 5 µL 25 mM MgCl ₂ , 250 µM de cada dNTP, 1.25 U Taq DNA Polimerase, 50 pmol de cada <i>primer</i> e 25 ng de DNA.	95 °C for 2 min; 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 2 min, 72 °C por 2 min; extensão final à 72 °C por 10 min.	KARAHAN; CETINKAYA, 2007.
ACCACAAGGTAAGTGAATCAACG TGCTTTCGATTGTTTCGATGC	<i>Côa</i>	759 pb	2 µL de DNA (aproximadamente 350 ng/µL), 1 µL de cada um dos <i>primers</i> (50 pmol), 0,8 µL do mix de dNTP (200 µM de cada), 0,2 µL de Taq polimerase (1 U), e 3 µL de PCR 10x <i>buffer</i> (500 mM de KCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.4; 1% Triton X-100; e 1,5 mM de MgCl ₂). O volume é ajustado com água estéril para 40 µL.	94°C for 2 min; 30 ciclos: 95°C por 30 segundos, 55°C por 2 minutos, e 72°C por 4 minutos; extensão à 72°C por 7 min.	SILVA; SILVA, 2005.
ACCACAAGGTAAGTGAATCAACG TGCTTTCGATTGTTTCGATGC	<i>Côa</i>	964pb; 740 pb; 870 pb, 612 pb	1 µl do lisado; 1 µM de cada <i>primer</i> , 200 µM de cada dNTP, 1 U of Taq Polimerase (Gibco, USA) e 3 µl de 10X PCR <i>buffer</i> , fazendo um volume total de 40 µl.	30 segundos à 95°C, 2 minutos à 55°C e 4 minutos à 72°C, com um total de 40 ciclos.	VIEIRA-DA-MOTTA et al., 2001.
GTAGATTGGGCAATTACATTTTG AGGCGCATCAGCTTTGTTATCC CATGTA	<i>Côa</i>	117 pb	2,5 µl de DNA bacteriano; 20 mM de Tris - HCl pH 8,0; 3 mM de MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 200µM de cada dNTP; 1 U de Taq Polimerase e 6 µl de cada <i>primer</i> e 2 ul de RW01 e DG74. Volume final 25 ul. * nesta reação utilizaram 4 <i>primers</i> .	Desnaturação inicial 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94° por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72° por 1 minuto; extensão final 7 minutos por 72°C.	MONTE, 2005.
ACCACAAGGTAAGTGAATCAACG TGCTTTCGATTGTTTCGATGC	<i>Côa</i>	Aprox. 800 pb	Volume final de 25µL, contendo: 20ng do DNA genômico, tampão PCR 10x (10mM Tris-HCl, pH 9,0; 50mM de KCl), 1,5mM de MgCl ₂ , 1µM de cada <i>primer</i> , 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's) e 1U de Taq DNA Polimerase, completando-se com água deionizada estéril.	40 ciclos térmicos, cada um consistindo de 30 segundos a 95°C, 2 minutos a 62°C e 4 minutos a 72°C.	ANDRADE, 2008a; LUZ, 2008.

* pares de bases.

Quadro 1 - Comparação das condições para PCR por diferentes autores

Fonte: Autoria própria, 2013

Estas etapas ou passos foram seguidos em diversas pesquisas para a padronização de PCR tradicional e suas variantes na detecção de patógenos (CASARIL, 2010; GARCIA et al., 2008; JORDÃO Jr. et al., 2005; PERES, 2007; MORESCO, 2008; PAULA et al., 2011; ZOCHE, 2005; FIGUEIREDO et al., 2008).

A padronização também é uma forma de se estudar e estabelecer possíveis soluções para as desvantagens relacionadas à reação, como no caso da presença de inibidores.

Casaril (2010), além da padronização, realizou ensaios de PCR padronizada para a detecção do micro-organismo alvo em amostras artificialmente e naturalmente contaminadas, a fim de mostrar a aplicabilidade.

A seguir são descritos os possíveis limitantes a adoção da inovação proposta nesta pesquisa.

2.3.3 Possíveis limitantes à adoção de diagnóstico molecular

Apesar da aplicação prática na biotecnologia de alimentos e o atendimento da necessidade exposta por Tang et al. (2009), a adoção da PCR por muitos laboratórios enfrenta barreiras. Como citado anteriormente, os condicionantes podem ser institucionais, econômicos e técnicos.

O condicionante econômico apontado é o custo do investimento tecnológico (GANDRA et al., 2008), principalmente quanto aos equipamentos. Entretanto, o alto investimento inicial pode ser compensado a médio ou longo prazo devido ao menor preço da análise por amostra (custo de reagentes utilizados por amostra) em relação aos métodos convencionais, como mostrado por Teodoro et al. (2006).

Dentro de condicionantes institucionais pode-se citar a falta de regulamentação por órgãos oficiais brasileiros (GANDRA et al., 2008; FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006) .

Internacionalmente, a PCR já está presente no controle de qualidade de alimentos nos laboratórios e nas linhas de produção. Entre os países que utilizam a PCR pode-se citar os Estados Unidos, que desenvolve e valida seus métodos moleculares para a triagem e identificação de patógenos para uso interno por meio das agências reguladoras, incluindo a *Food and Drug Administration* (FDA),

disponibilizados no *Bacteriological Analytical Manual* e no *Microbiology Laboratory Guidebook* (GE; MENG, 2009).

No que diz respeito aos condicionantes técnicos, há a falta de instruções padronizadas (FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006). Na padronização, limitantes inerentes à técnica e à amostra alimentícia são estudadas, como a presença de inibidores e células mortas. Malorny et al. (2003) citam que a padronização deve ser dinâmica; assim a publicação de normas não é o final, mas um novo início da pesquisa, pois cepas emergentes e importantes devem estar sendo continuamente testadas para a verificação da sensibilidade do método padrão.

Gironesa et al. (2010) reforça que os vários testes fundamentados em técnicas moleculares para detecção de patógenos e indicadores desenvolvidos devem ser validados e padronizados para que sejam implementados na rotina dos laboratórios e aplicados em diversas matrizes.

Mão de obra qualificada também pode ser um limitante. Ao envolver temas chaves como segurança e qualidade no desenvolvimento agroalimentar, fatores críticos como baixa qualificação de mão de obra, legislação ultrapassada, falta de monitoramento por meio de kits de laboratório, baixo investimento em ferramentas para o controle do processo, falta de metodologia analítica com nanotecnologia, são sempre destacados (SENAI, 2007).

Mañas (2001) menciona ainda barreiras burocráticas, dentre as quais isolamento da alta administração, intolerância com os pesquisadores, dificuldade da inovação se estabelecer em curto prazo, rigidez da organização e incentivos inadequados aos pesquisadores.

3 METODOLOGIA

3.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA

O método científico empregado nesta pesquisa é o Método Indutivo, onde as premissas são verdadeiras e conduzem a conclusões prováveis (MARCONI; LAKATOS, 2001).

Do ponto de vista da sua natureza, é uma pesquisa aplicada, na qual de acordo com Silva e Menezes (2005) o objetivo é buscar soluções envolvendo verdades e interesses locais. Assim, a pesquisa visa abordar e buscar informações em relação à mudança de técnicas de controle de qualidade na agroindústria de uma região.

A abordagem do problema foi realizada de forma qualitativa, na qual não se traduz os resultados em números (ALVEZ-MAZZOTTI; GEWANDSZNAJDER, 2004). Assim, as informações obtidas nos questionários são tratadas de forma qualitativa, devido ao pequeno número de empresas que compõe a amostra. Os resultados da análise laboratorial também são tratados qualitativamente, pois correspondem à ausência ou presença do organismo alvo.

Do ponto de vista do seu objetivo geral, a pesquisa é descritiva, pois visa descrever as características de determinada população ou fenômeno ou o estabelecimento de relações entre variáveis (GIL, 2002). Também pode ser classificada como explicativa, quando observados seus objetivos específicos, por pretender identificar os fatores que levam a ocorrência dos fenômenos, devido à utilização de questionário e experimentos laboratoriais.

Quanto aos procedimentos técnicos utilizados classifica-se como levantamento. Neste caso, segundo Gil (2002) ocorre a interrogação direta com as pessoas (gestores) cujo comportamento se deseja conhecer. Em relação à etapa da pesquisa que se restringe ao alcance de determinados objetivos específicos, referente aos ensaios para detecção de um patógeno, apresenta caráter experimental.

3.2 PERFIL DAS EMPRESAS DE BASE AGROALIMENTAR EM ESTUDO

Para delimitar a população a ser estudada dois critérios foram estabelecidos, sendo:

- Empresas do ramo alimentício na região dos Campos Gerais com laboratório de microbiologia de alimentos;
- Empresas com gestores do controle de qualidade responsáveis direta ou indiretamente pelo desenvolvimento ou adoção de novos produtos, tecnologias e processos.

A partir do estabelecimento destes critérios, as empresas foram identificadas por meio da Vigilância Sanitária de cada município que compõe a região, no total 24 municípios de acordo com o Dicionário Histórico e Geográfico dos Campos Gerais (UEPG, 2011). Foram encontradas sete empresas que se adequavam ao estudo, sendo delimitada a amostra final em seis. Uma empresa dentre as selecionadas não participou da pesquisa, pois o gestor citou que a empresa não apresentou interesse.

As empresas são identificadas como E1, E2, E3, E4, E5, e E6 devido ao comprometimento em não divulgar seus nomes.

3.3 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS NAS EMPRESAS

3.3.1 Elaboração e avaliação do instrumento de coleta de dados

O questionário foi desenvolvido em consonância com o descrito por Moreira e Caleffe (2008). Este tipo de instrumento de coleta de dados foi aplicado nesta pesquisa de pequena escala por proporcionar uso eficiente do tempo e possibilitar alta taxa de retorno e perguntas padronizadas (MOREIRA; CALEFFE, 2008).

Além das indicações citadas acima, o questionário foi elaborado com base em outros elaborados por Natume (2007) e Abreu (2007). Também houve adequação às recomendações de Marconi e Lakatos (2001) e Pilatti, Pedroso e Gutierrez (2010).

O questionário apresenta perguntas abertas e fechadas. As perguntas abertas, livres ou não limitadas não influenciam as respostas, o que permite discutir

de forma mais ampla pelo fato de fornecer explicações e comentários, enquanto, as perguntas fechadas, limitadas ou de alternativas fixas são de fácil aplicação, promovem facilidade e rapidez no ato de responder, além do menor risco de parcialidade pelo entrevistado.

Etapas foram cumpridas na elaboração do questionário, como: preparação de perguntas sobre o tema proposto, seleção das perguntas formuladas, determinação da ordem de apresentação, limitação do número para evitar fadiga e desinteresse e verificação de espaço para respostas das perguntas abertas. Houve também a preocupação de apresentar nota explicativa no início do questionário para que o informante soubesse os objetivos da pesquisa.

A avaliação do questionário foi realizada por meio da validação por especialistas, pré-teste ou teste piloto e comparação dos resultados obtidos em uma empresa da amostra em momentos distintos a fim de verificar a estabilidade do instrumento de pesquisa.

A validação foi realizada por um especialista da área de biotecnologia e um especialista da área de inovação tecnológica, com avaliação criteriosa de cada item do questionário avaliando seu conteúdo, aplicabilidade, clareza e objetividade, conforme recomendado por Natume (2007).

O pré-teste ou teste piloto é fundamental para evidenciar falhas, pois não há entrevistador entre o respondente e o item, sem espaço para negociar ou esclarecer o significado da pergunta (MARCONI; LAKATOS, 2001; MOREIRA; CALEFFE, 2008).

Uma empresa entre as selecionadas respondeu o questionário na fase do teste-piloto. A empresa testada deve ter as mesmas características da amostra para que o teste piloto seja válido (NATUME, 2007).

A repetição da aplicação do questionário foi realizada com a mesma empresa envolvida no teste piloto, em três momentos distintos e verificou-se, junto ao respondente, se houve dúvidas durante o preenchimento dos itens na primeira aplicação (teste piloto).

O questionário na versão final pode ser visto no Apêndice A, apresentando em sua estrutura, de modo geral, questões sobre: análises microbiológicas de alimentos, conhecimentos específicos de análises, recursos humanos e financeiros

da empresa, percepção dos gestores em relação ao tema proposto e elementos do processo inovativo.

3.3.2 Aplicação do questionário

Após as adequações necessárias no questionário foi realizada a comunicação com as empresas por telefone e via e-mail em função das atividades e disponibilidades dos informantes.

No primeiro momento de contato com os gestores fez-se uma breve explicação da pesquisa e dos objetivos que visa alcançar. Também foi relatada em qual instituição de ensino a pesquisa está sendo desenvolvida. Em seguida, deixou-se claro o comprometimento em manter sigilo em relação aos nomes e marcas da empresa, sendo então encaminhados os questionários por via eletrônica para todos, sendo recebidos da mesma forma.

Estes procedimentos facilitam a pesquisa, pois pode promover menor resistência e influenciar o gestor de forma positiva, ao responder de forma mais fidedigna.

3.4 ETAPAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

3.4.1 Amostras

As amostras de *Staphylococcus aureus* utilizadas consistem em duas cepas padrão a ATCC 6538P e a ATCC 25923 e um isolado de leite, codificadas como SA1, SA2 e SA3 respectivamente.

As amostras foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura líquido, com seguinte composição para 1000 mL de água destilada: 5 g de peptona bacteriológica, 3 g de extrato de levedura, 1,5 g de extrato de carne e 1g de glicose. As amostras foram repicadas no meio estéril e mantidas por 24 horas em estufa a 37 °C para extração de DNA.

As amostras de cepas padrão foram obtidas de culturas com concentração igual a 1% e a amostra isolada de leite (SA3) foi transferida para o caldo por meio da

coleta de colônias em ágar BHI (Brain Heart Infusion). Os tubos com as culturas foram armazenados sob refrigeração (± 7 °C). As cepas foram repicadas a cada extração de DNA.

As amostras alimentícias utilizadas foram adquiridas no comércio local, submetidas à extração direta seguida da amplificação das duas regiões mostradas no Quadro 2, item 3.4.4. As amostras analisadas são produtos cárneos, linguiças variadas produzidas na região de estudo, comumente contaminadas com o micro-organismo alvo. Assim, não foram submetidas à contaminação artificial. Foram analisadas cinco amostras de embutidos cárneos, sendo: linguiça frescal, linguiça calabresa, linguiça toscana, linguiça blumenau e linguiça fina frescal.

3.4.2 Isolamento de DNA

Foram testados cinco protocolos de extração de DNA, devido às características do micro-organismo. Os protocolos são apresentados em detalhes no anexo A e a seguir em resumo:

- Método de extração 1: adaptado de Moreira et al. (2010), fundamenta-se no uso de detergente SDS (dodecil sulfato de sódio), proteinase K, CIA (clorofórmio e álcool isoamílico) e etanol;
- Método de extração 2: descrito por Chapman et al. (2001), fundamenta-se na lise térmica, sem o uso de reagentes e enzimas;
- Método de extração 3: proposto por Chapaval et al. (2006), emprega CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), proteinase K, CIA, isopropanol e etanol;
- Método de extração 4: adaptado de Millar et al. (2000), tem como base a desproteinização com CIA e precipitação de DNA em etanol;
- Método de extração 5: descrito por Luz (2008), faz-se a aplicação de lizosima, proteinase K, STE (2,5% SDS, 10 mM Tris-HCl, 0,25 M EDTA), acetato de amônio, CIA e isopropanol.

3.4.3 Verificação da qualidade do DNA extraído

Para verificação da qualidade do DNA extraído de cada amostra, foi realizada eletroforese (SAMBROOK; RITSCH; MANIATIS, 1989), utilizando gel de agarose (0,8%) em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 1X (EDTA pH 8,0 0,5M; Tris-Base; Ácido Bórico; H₂O), na qual 5 µL de TC (Tris-HCl pH 8,0; EDTA pH 8,0; Sacarose; Azul de Bromofenol; Brometo de etídeo) adicionado de 5 µL de amostra foram aplicados no gel. Após o gel ser submetido a uma corrente constante (30 min/70 volts para gel de 30 mL), imergiu-se o gel em brometo de etídio a 0,5 µg/mL durante 15 minutos.

Para visualização das bandas foi realizada a exposição do gel em transiluminador violeta e captação da imagem pelo *software LPix Image*.

3.4.4 Condições de amplificação do DNA

Para o estudo dos oligonucleotídeos iniciadores, da concentração dos reagentes, das condições de amplificação dos fragmentos foi elaborado um quadro comparativo baseando-se em trabalhos publicados, como foi simplificado Quadro 1. A partir desse quadro foram estabelecidas as condições da PCR para este trabalho e os oligonucleotídeos iniciadores mostrados abaixo. Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela *Ludwig Biotec*.

Oligonucleotídeos iniciadores	Gene Alvo	Tamanho	Referência
5' ACCACAAGGTAAGTGAATCAACG 3' 5' TGCTTTTCGATTGTTTCGATGC3'	<i>coa</i>	Variável 612 a 1000 pb	ANDRADE, 2008a; VIEIRA-DAMOTTA et al., 2001; LUZ, 2008
5' GCGATTGATGGTGATACGGTT 3' 5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC 3'	<i>nuc A</i>	270 pb	PINTO; CHENOLL; AZNAR, 2005.

Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados
Fonte: Autoria própria, 2013

Os genes *coa* e *nuc A* foram escolhidos, pois são codificadores das enzimas coagulase e termonuclease, indispensáveis para determinação deste patógeno.

A PCR foi realizada com adaptações (Tabela 1), de acordo com Luz (2008) para o gene *coa* e conforme Pinto, Chenoll e Aznar (2005) para o gene *nuc A*, apresentando volume final de 25 μ L.

Tabela 1 – Concentração dos componentes da PCR realizada para cada gene

Componentes	Concentração	
	Gene <i>coa</i>	Gene <i>nuc A</i>
DNA genômico	Aprox. 40 ng	Aprox. 40 ng
Tampão PCR 10x	1x	1x
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
Oligonucleotídeo iniciador 1	1 μ M	1 μ M
Oligonucleotídeo iniciador 2	1 μ M	1 μ M
dNTP's	200 μ M	400 μ M
Taq DNA polimerase	1,5 U	1,5 U
Água deionizada estéril	Volume necessário para completar 25 μ L	

Fonte: Autoria própria, 2013

Para verificar o tempo e a quantidade de ciclos para a amplificação foram testadas as condições apontadas por Luz (2008) e Pinto, Chenoll e Aznar (2005). Entretanto, a partir das diferentes temperaturas de hibridização observadas na literatura e nas temperaturas médias indicadas pelo fabricante dos oligonucleotídeos iniciadores, foram testados intervalos de temperatura para realizar PCR com gradiente de temperatura, em termociclador *Axygen Maxigene®*, a fim de encontrar a temperatura ideal de hibridização.

Vale ressaltar, que nesta etapa do estudo, foi utilizado DNA extraído da cepa padrão ATCC 25923 pelo método 3, utilizada posteriormente como controle positivo nas demais reações.

3.4.5 Avaliação da amplificação

Para visualização dos produtos amplificados foi utilizada eletroforese, onde a aplicação do produto da reação e do marcador de peso molecular (100 pb *EasyGen* e *Amresco*) foram realizadas empregando gel de agarose 1,5%. O gel foi submerso em TBE 1X (EDTA pH 8,0 0,5M; Tris-Base; Ácido Bórico; H₂O) e então submetido a

uma corrente constante de 80 volts por 1 hora (gel de 60 mL). Em seguida, foram realizadas as mesmas atividades descritas no item 3.4.3 para a visualização das bandas obtidas.

A partir do marcador de peso molecular são determinados os resultados como ausência ou presença do micro-organismo alvo.

3.4.6 Diagnóstico molecular para detecção de *S. aureus* em amostra alimentícia

A partir do estabelecimento do protocolo de isolamento de DNA e das condições de amplificação, realizou-se diagnóstico molecular de *S. aureus* em amostras alimentícias contaminadas naturalmente, por meio da detecção do gene *coa* e do gene *nuc A*, a fim de verificar as dificuldades intrínsecas à matriz alimentícia.

Na amplificação do gene *coa*, fez-se teste com os métodos de extração 2 (lise térmica) e 4 (lise térmica e desproteínização), por não permitirem a visualização apropriada da qualidade do DNA. A partir do resultado foi estabelecido o método de extração a ser adotado e indicado na pesquisa.

Uma etapa de pré-enriquecimento foi realizada para o aumento das células microbianas, consistindo na adição das amostras em água peptonada tamponada (25 g em 225 mL) por 24 horas a 37 °C. A água peptonada tamponada foi alterada quanto à quantidade de NaCl, sendo adicionada de 8,5 g de NaCl a cada litro, favorecendo o crescimento de *S. aureus* e auxiliando na inibição da microbiota competidora.

As amostras utilizadas foram linguças por apresentarem alto conteúdo protéico e gorduroso, importantes interferentes na reação em cadeia da polimerase. Foi utilizado um número pequeno de amostras, pois a necessidade no momento foi verificar a eficiência da reação para um tipo de alimento complexo e com a extração direta proposta. Todas as amostras são produzidas e comercializadas na região dos Campos Gerais.

3.5 MAPEAMENTO DE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES

Para o mapeamento dos tipos de diagnóstico molecular aplicáveis na indústria alimentícia da região foi realizado um breve levantamento sobre os métodos de detecção, mostrando se os mesmos são indicados nas legislações vigentes.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

A análise dos dados é qualitativa e consequentemente descritiva.

No caso da aplicação do questionário, o fundamental é compreender e interpretar o exposto pelo participante/informante, por meio da extração e análise das respostas sobre o tema exposto utilizando análise de conteúdo conforme Conde e Araújo-Jorge (2003).

A análise de dados do diagnóstico molecular também é qualitativa, devido à geração de dados binários, sendo assim assume-se o resultado gerado. Pode haver a presença de falsos positivos, por isso, novos testes foram realizados buscando exatidão nos resultados qualitativos. Esta pesquisa apresenta pequeno número de amostras de alimentos, necessário para mostrar as etapas do desenvolvimento da tecnologia molecular e não a incidência do patógeno num universo amostral.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Após a avaliação dos especialistas, reformulou-se o questionário conservando os itens e explicitando o conteúdo de forma mais adequada por meio da modificação da redação. Em seguida, foi realizado o teste piloto numa empresa dentre as selecionadas para esta pesquisa.

Tais avaliações, mas principalmente o teste piloto, serviu para verificar se o questionário apresentava elementos importantes como: credibilidade, validade e operatividade. Esses elementos que devem ser observados (MARCONI; LAKATOS, 2001), estiveram presentes segundo as respostas obtidas.

Logo após as etapas iniciais de avaliação, o questionário avaliado pelos especialistas e por meio teste piloto foi respondido pela mesma empresa onde se realizou o teste piloto a fim de verificar sua estabilidade. Os resultados nos três momentos (teste piloto e duas vezes pós-teste piloto) foram similares, o que evidencia a estabilidade necessária. Desse modo, o questionário foi então aplicado nas demais empresas e o resultado da empresa que realizou o pré-teste não foi descartado, visto não estar comprometido.

Semelhante ao trabalho de Natume (2007), que pesquisou os processos de inovação em indústrias de alimentos de Ponta Grossa, Paraná, por meio de questionário, não foram realizadas no instrumento de pesquisa alterações relevantes, sem comprometer os dados coletados no pré-teste.

4.2 LIMITANTES À ADOÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NAS EMPRESAS

4.2.1 Posicionamento empresarial frente à adoção de técnicas moleculares

No ambiente organizacional, inovar exige coordenar vários recursos internos e externos da organização, como: os recursos financeiros, a disponibilidade de mão de obra, as habilidades técnicas, os sistemas de informação e o conhecimento acerca da tecnologia que se deseja incorporar (ABREU, 2007).

Os recursos das empresas em estudos são discutidos a partir da pesquisa realizada por meio de questionário. Mas, é importante destacar suas características (Quadro 3).

Empresa	Atividade
E1	Terceirização de análises microbiológicas, físico-químicas e químicas de matéria-prima (para produção de alimentos e rações), alimentos processados de origem animal e vegetal, água, rações entre outros produtos
E2	Terceirização de análises microbiológicas de alimentos prontos e matéria-prima para elaboração de alimentos
E3	Produção de leite e derivados lácteos
E4	Produção de alimentos pré-preparados, sobremesas, carnes e derivados, margarinas e óleos vegetais
E5	Produção de leite pasteurizado e derivados lácteos
E6	Produção de carnes e derivados, alimentos pré-preparados, alimentos à base de soja e leite e derivados

Quadro 3 – Atividade das empresas selecionadas
Fonte: Autoria própria, 2013

Estas empresas processadoras de alimentos possuem características representativas, algumas são exportadoras (E4 e E6), outras com alto percentual de *market share* (E3, E4 e E6) e filiais em outras regiões (E4, E5 e E6).

As empresas que terceirizam análises (E1 e E2) também são avaliadas pelo fato de atenderem empresas processadoras de alimentos e pequenos produtores na mesma região, além de realizarem estudo colaborativo com as empresas em estudo. Possuem relações interlaboratoriais, realizando análises da mesma amostra com métodos iguais, a fim de avaliar os resultados obtidos.

A caracterização quanto ao segmento que atuam (produtos ou serviços), ao *market share* que possuem, ao mercado que atendem (regional, nacional e internacional) e aos métodos analíticos que utilizam em seus laboratórios darão suporte para a discussão dos resultados, sendo que essas características serão ligadas e somadas às respostas.

4.2.1.1 Rotina laboratorial nas empresas

Na rotina laboratorial são realizados os seguintes diagnósticos: coliformes totais (todos), coliformes termotolerantes (todos), contagem total de mesófilos (E1, E3, E4, E5 e E6), contagem de psicrotóxicos (E1, E3 e E6), *Staphylococcus aureus* (todos), *Clostridium* sulfito redutor (E1, E4 e E6), *Listeria sp.* e *Listeria monocytogenes* (E1, E4, E5 e E6), bolores e leveduras (E1, E3, E4 e E6), *Pseudomonas sp.* (E6), *Salmonella sp.* (todos), *Bacillus cereus* (E1, E4 e E6), esporos viáveis a 80 °C e 100 °C (E1, E3 e E6), bacteriófagos (E6), *Escherichia coli* (todos, E6: *E. coli* O157:H7), bactérias halofílicas (E6), *Yersinia enterocolítica* (E6), bactérias lácticas (E1 e E6), contagem de bactérias termófilas (E3) e diversas enterobactérias (E1).

Para tanto, todas as empresas indicam a utilização de técnicas que compõem os métodos clássicos, sendo: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, semeadura em meio sólido seletivo-diferencial e identificação bioquímica e sorológica das colônias suspeitas. Essas técnicas empregadas compõem os métodos oficiais para a análise microbiológica de alimentos de origem animal e água (BRASIL, 2003), além de serem indicados pelo *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012).

Ao responderem a pergunta que se refere ao micro-organismo de mais difícil detecção com os métodos utilizados nos respectivos laboratórios, os informantes citaram as análises mais trabalhosas, a detecção de *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. A detecção de *Yersinia* foi relatada por E6, indicando que o meio de cultura necessário deve ser preparado, com os componentes da formulação adquiridos para seu preparo.

Além disso, os participantes indicaram micro-organismos para desenvolvimento de análises para a rotina dos laboratórios, sendo: *Campylobacter sp.*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Samonella sp.* e *Clostridium sp.* Estes micro-organismos estão associados a técnicas trabalhosas, compostas de várias etapas de cultivo e identificação, ressaltando a importância do tempo de análise e praticidade.

Testes rápidos e sensíveis já foram desenvolvidos para estes micro-organismos, destacando os imunológicos e moleculares, porém em alguns casos não difundidos ou ainda inviáveis para as empresas.

Assim, as empresas também foram questionadas quanto ao uso de testes rápidos. A empresa E6 indicou utilizar método de biologia molecular, por meio do BAX® System automatizado (ensaios de PCR que detectam com segurança a sequência de DNA alvo) (FRANCHIN et al., 2006; DUPONT, 2011; MOURA et al., 2011), para a detecção de um patógeno em amostras de alimentos. Isso pode estar atrelado ao seu porte, pois dentre as empresas é a maior em termos de produção, além de ser exportadora de diversos tipos de alimentos de origem animal.

A relação positiva entre inovação e exportação ou tamanho já foi relatada por Conceição (2011) em seu estudo, no qual também indica a importância dada pelas empresas às inovações de produto e processo para o enquadramento em normas-padrão. Porém, já se observou que tais normas podem exercer efeito contrário.

As empresas de grande porte, segundo Natume (2007), possuem mais condições para inovar e inovam constantemente em diferentes áreas dentro da empresa, como em produtos, processos, aplicação de novos materiais, entre outros.

As empresas E1 e E5 fazem uso de testes imunoenzimáticos, difundidos na análise de alimentos por serem rápidos, práticos e de fácil utilização. Testes imunoenzimáticos são amplamente empregados na detecção de *Salmonella sp.*, por exemplo, em amostras alimentares e ambientais (RÜCKERT, 2006).

Métodos rápidos, além de permitir a abreviação do tempo de análise, promovem, conseqüentemente, o aumento da produtividade do laboratório e simplificação do trabalho realizado.

Contudo, sabe-se que adotar tecnologia específica geralmente não é tarefa fácil por depender da análise de diversas variáveis (IPARDES, 2011). Desta forma, a adoção de diagnóstico molecular na rotina dos laboratórios foi questionada. As empresas E1, E4, E5 e E6 adotariam e implantariam tecnologias moleculares em suas rotinas. Porém, E2 e E3 indicam não ter o interesse, fato melhor compreendido a seguir.

A adoção de novas tecnologias é uma questão que deve ser observada constantemente, pois as inovações são decisivas para o sustento das empresas no mercado. Ao mesmo tempo, essa questão deve estar relacionada com os objetivos da empresa, como redução de custos, melhoria de produtos, desenvolvimento de novos produtos, entre outros (BATALHA et al., 2008). Neste caso, as tecnologias moleculares vão de encontro a alguns objetivos apresentados por Batalha et al.

(2008), pois apresentam menor tempo para a realização da análise e obtenção de resultados e permitem garantir alimento seguro.

Outro aspecto determinante para a adoção de uma inovação é a legislação vigente. Como já citado, a legislação ultrapassada é um fator crítico ao se discutir segurança e qualidade no desenvolvimento agroalimentar (SENAI, 2007). De fato, as empresas E4, E5 e E6 informam que a legislação vigente é o principal fator que leva à inovação de métodos analíticos.

Ressalta-se, portanto, que as normas impostas podem bloquear ou impulsionar a inovação.

A legislação brasileira que determina os métodos oficiais para análise microbiológica de alimentos de origem animal e água (IN 62 de 26 de agosto de 2003 - MAPA) (BRASIL, 2003) não apresenta métodos moleculares, porém menciona que em determinado caso método molecular pode ser utilizado para identificação de *Salmonella spp.*. A legislação sobre padrões microbiológicos para alimentos (RDC 12, de 2 de janeiro de 2001) (ANVISA, 2001) indica:

“As metodologias para amostragem, colheita, acondicionamento, transporte e para análise microbiológica de amostras de produtos alimentícios devem obedecer ao disposto pelo Codex Alimentarius; "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (I.C.M.S.F.); "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" e "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" da American Public Health Association (APHA); "Bacteriological Analytical Manual" da Food and Drug Administration, editado por Association of Official Analytical Chemists (FDA/AOAC), em suas últimas edições e ou revisões, assim como outras metodologias internacionalmente reconhecidas.”

Nos órgãos citados acima, métodos moleculares fundamentados em PCR estão oficializados. No Brasil, foi oficializado em instruções normativas específicas ensaios de PCR para detecção de *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* em amostras de alimentos como método alternativo (BRASIL, 2004; BRASIL, 2012).

Pode-se então dizer que a legislação é um limitante à adoção de técnicas moleculares nas rotinas laboratoriais, limitante já apontado por Gandra et al. (2008) e Freitas, Lemos e Marin (2006), pois a instrução normativa mais abrangente (BRASIL, 2003) foca nos métodos convencionais e a RDC 12 apenas faz indicações, por não ser o objetivo desta apontar métodos analíticos.

4.2.1.2 Falta de conhecimento dos gestores

A disseminação de informação e conhecimento possibilita potencializar a inovação (MÂCEDO; BARROS; CÂNDIDO, 2010). Desse modo, a informação e o conhecimento são fatores importantes para a transferência de tecnologia, principalmente quando atrelada à segurança alimentar e saúde pública.

Assim, foi possível verificar que apenas uma empresa, a E2, desconhece a aplicação de tecnologias moleculares na detecção de micro-organismos, sendo que tal desconhecimento justifica sua falta de interesse na adoção de diagnóstico molecular. O desconhecimento é de certo modo incompatível, visto ser uma empresa que terceiriza diagnóstico, embora disponibilize um número pequeno de análises.

Quanto à busca de informação na área, todos os gestores informaram que as empresas buscam informação regularmente por meio de consultas a revistas, sites, entre outros, além disso, todas as empresas estão envolvidas com pesquisas desenvolvidas com parcerias.

Pode-se verificar que a fonte de informação é interna (desenvolvimento de pesquisas) e externa (informações originadas fora das empresas). A informação é um fator do processo inovativo reconhecido pela sua importância, devido a redução da incerteza sobre a inovação a ser adotada.

Com a relação a parcerias, Cabral (2007, p. 103) afirma:

“a parceria de empresas alimentícias com instituições privadas e públicas de Pesquisa & Desenvolvimento tem se apresentado como muito efetiva em alavancar a atividade inovativa de empresas na indústria brasileira de alimentos”.

Cabral (2007) ressalta ainda que as empresas alimentícias serão mais ativas na atividade inovativa quando utilizarem como estratégia a alavancagem de suas parcerias com empresas, instituições e universidades. Conclui ao final de seu estudo, que incentivar as parcerias das empresas para o desenvolvimento de projetos inovativos, entre outras ações deve elevar a inovatividade na indústria brasileira de alimentos. Assim, as empresas estão caminhando na direção correta, para o ganho de vantagens no mercado em que estão inseridas.

Esse interesse e/ou necessidade de adquirir conhecimento por meio de parcerias são inerentes às empresas e profissionais que desejam se manter no mercado. As empresas atuantes no setor alimentício, estão sempre buscando atender a demanda de alimentos seguros, de maior qualidade e devem estar atentas a alta concorrência. Isto faz com que as empresas busquem novos e avançados conhecimentos e novas tecnologias, aspectos citados como indispensáveis para a sobrevivência e prosperidade de uma empresa (BRAUN; HADWIGE, 2011).

Neste sentido, todos os participantes possuem interesse em cursos de tecnologia molecular, sendo a principal motivação o interesse técnico (E2, E3, E4, E5 e E6) e em seguida a utilização na rotina (E1 e E6). A E3 inclui em sua resposta o tempo como um fator que dificulta a participação em cursos devido às atividades desenvolvidas na indústria.

Entretanto, quanto à carga horária desejada do curso não houve consenso. A E1 expõe que a ementa do curso em tecnologias moleculares seria outro fator decisivo. Para eliminar essas possíveis barreiras, sugere-se a interação entre universidade e indústria para desenvolvimento de cursos adequados às necessidades das empresas, visto que podem influenciar positivamente e significativamente a capacidade de inovar dos envolvidos, levando em consideração o interesse que demonstraram pelas tecnologias moleculares.

O foco no conhecimento básico e no saber-fazer orientado para as aplicações é citado por Reis (2008), o qual aponta também as diversas motivações para que as empresas firmem a relação universidade-empresa, dentre as quais estão adquirir novos conhecimentos da ciência e tecnologia e obter acesso à inovação e apoio técnico.

Destaca-se ainda que a aprendizagem pode conduzir a aplicação do conhecimento adquirido em produtos, serviços e práticas o que levará uma organização a obter ganhos a partir dele (MASSA; TESTA, 2009).

4.2.1.3 Desenvolvimento de recursos humanos em diagnóstico molecular

O sucesso da introdução de novas tecnologias depende essencialmente da capacidade da empresa em absorver novos equipamentos, sistemas e processos, o que abrange a incorporação de novas rotinas, procedimentos e informações técnicas

que dependem da capacidade dos recursos humanos de transformar a informação em conhecimento (TIGRE, 2006).

Desse modo, foram verificadas a disponibilidade de recursos humanos na empresa para implementar tecnologias moleculares e a formação dos colaboradores envolvidos no controle de qualidade, relacionados ao sucesso de implantação de uma nova tecnologia.

Em todas as empresas há disponibilidade de profissionais, exceto na empresa E2. A formação dos colaboradores está distribuída em Tecnologia em Alimentos, Medicina Veterinária, Técnico em Química, Técnico em Meio Ambiente, Zootecnia, Química e Engenharia de Alimentos. A partir desta informação, pode-se então dizer com base na formação dos colaboradores que os laboratórios possuem recursos humanos capazes de utilizar as tecnologias moleculares.

4.2.1.4 Recursos financeiros como condicionante a inovação

Os condicionantes econômicos são os mais considerados, mesmo quando o investimento refere-se a uma inovação que irá proporcionar maior credibilidade, devido aos custos gerados na implantação e a expectativa do retorno dos investimentos (TIGRE, 2006).

Desse modo, a disponibilidade financeira para a implantação de tecnologias moleculares foi indicada por apenas duas empresas (E4 e E6), com filiais em diversas regiões do país e grandes exportadoras de alimentos, fato não observado nas demais. Tigre (2006) destaca que empresas de grande porte apresentam maior facilidade em investir em inovações, reforçando o resultado observado nesta pesquisa. A disponibilidade de recursos financeiros para a capacitação dos analistas não foi verificada somente na E2.

Pode-se dizer neste ponto que, para a maioria das empresas o custo da implantação está limitando o uso de tecnologias moleculares pelos laboratórios de microbiologia de alimentos, embora haja a disponibilidade de recursos por meio de fontes de fomento, como já mencionado.

A relação custo/benefício é considerada por todas as empresas ao se adotar um novo método. Essa relação tem forte influência por ligar esses dois importantes aspectos para empresas de qualquer ramo.

4.2.1.5 Percepção dos gestores em relação às técnicas moleculares

A visão sobre a utilização da biotecnologia molecular e análise de DNA na indústria de alimentos como auxiliar no controle microbiológico foram distintas e são transcritas a seguir.

A E5 cita que “As indústrias de alimentos devem primeiramente estruturar seus laboratórios e intensificar treinamentos de seus funcionários para inserção da metodologia.” E4 relaciona a importância da análise de DNA na indústria escrevendo “Considero importante devido à confiabilidade e agilidade na emissão de resultados”.

E3 não adotaria diagnóstico molecular, por não acreditar ser real no setor, pois menciona que:

“É de grande valia pela capacidade de atuação na área e sua especificidade, talvez ainda esteja um pouco longe da realidade da maioria das indústrias. Mas em grandes grupos industriais onde realiza-se pesquisas já faz parte da rotina.”

Já E6 relata o caso da empresa:

“Na nossa empresa utilizamos o sistema Bax®, mesmo apresentando um custo mais elevado é muito importante, devido o menor tempo de análise e maior rapidez na emissão de laudos, possibilitando assim menor custo com armazenamento e diárias no porto de embarque para o exterior.”

E1 descreve:

“Hoje viso com a metodologia molecular uma rapidez na análise e liberação de lotes de produção. Transformar a lentidão do laboratório em principal instrumento de apoio a indústria alimentícia que está se especializando na geração de alimentos seguros.”

No entanto, E2 relata “Não tenho conhecimento sobre o assunto”. Este caso é destaque devido ao desconhecimento a respeito de diagnósticos moleculares, mostrando atraso em relação às demais em todos os itens pesquisados. Entretanto, de maneira geral as respostas geradas evidenciam conhecimento do tema superficial.

Conde e Araújo-Jorge (2003) citam que a inovação deve ser associada ao aprendizado e há necessidade de capacitação para que seja gerada e/ou adotada (CONDE; ARAÚJO-JORGE, 2003). Este fato aponta então uma barreira à inovação devido à falta de conhecimento do gestor.

Mas, de modo geral, podemos observar que a visão dos gestores é positiva, pois destacam os benefícios relacionados como aumento da confiabilidade, rapidez na emissão de resultados e especificidade, benefícios também destacados por diversos pesquisadores (GANDRA et al.; 2008; RÜCKERT, 2006; TANG et al., 2009; ANDRADE et al., 2010; FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006; SINGH et al., 2011; GRADY et al., 2008; SUBRAMANIAN et al., 2006; PASSO, 2009; OLSEN, 2000; VALONES et al., 2009; FORSYTHE, 2002).

A análise das visões/percepções aponta a tendência na preocupação com o tempo de análise, devido aos custos embutidos na espera de laudos. A E6 destaca o emprego do Sistema Bax®. Para o gestor o custo do teste é alto, mas o ganho com a rapidez de diagnóstico e com a redução de custos de armazenamento é compensatório.

A percepção quanto à credibilidade atrelada à inovação nas análises laboratoriais foi positiva. Assim, a inovação em biotecnologia é reconhecida pela sua importância.

4.2.1.6 Elementos do processo inovativo

Quanto à motivação na adoção de tecnologias moleculares, as empresas indicam como principais: tempo de análise, praticidade, confiabilidade, especificidade e sensibilidade. A confiabilidade (E2, E5 e E6) e o tempo de análise (E1, E4 e E6) foram as características mais indicadas. Tais motivações são aspectos relevantes quando tecnologias analíticas são discutidas.

A confiabilidade dos resultados é citada, pois se deve assegurar a saúde pública. Para tanto, o método a ser adotado por um laboratório deve apresentar exatidão, precisão, baixo limite de detecção, sensibilidade e especificidade adequados à análise proposta (FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006).

O tempo de análise é apontado devido à espera necessária para a realização de análises com métodos convencionais. Andrade et al. (2010) citam que se levam

dias ou até semanas para a obtenção de resultados por meio de métodos convencionais. Apontaram tal problema a necessidade de métodos que demandem de menor tempo para o controle da fabricação de alimentos.

A análise para a identificação de *Campylobacter sp.* em alimentos, por exemplo, com o método convencional necessita de 6 a 7 dias para a obtenção de resultados conclusivos, enquanto que com métodos fundamentados em PCR pode-se emitir resultados conclusivos entre 5 horas a 24 horas (DAMAS; MARASSI, 2010; PASSO, 2009). Este tempo de espera representa muito para as empresas, principalmente para aquelas que produzem alimentos perecíveis, como é o caso das empresas processadoras em estudo.

Já, a busca por novas tecnologias para análise de alimentos foi apontada da seguinte forma pelas empresas: E1, E3, E5 e E6 buscam frequentemente e E2 e E4 às vezes, quando acham necessário. A frequência com que as empresas buscam novas tecnologias de diagnóstico foi questionada como uma forma de analisar a propensão das mesmas em inovar seus métodos analíticos. Desta forma, foi possível observar que as empresas que as buscam, às vezes, não fazem uso de técnicas diferenciadas.

As inovações são implantadas nas empresas para sanar problemas (E1, E2 e E5), otimizar processos (todas), melhorar produto (E6), reduzir perdas (E5 e E6) e aumentar competitividade (E6).

Otimizar processos foi resposta assinalada por todas as empresas, contrariando o resultado observado por Natume (2007) em que as empresas do ramo alimentício inovam em sua maioria para melhorar a qualidade de seus produtos, a fim de manter a participação e sobrevivência no mercado. Entretanto, a otimização de processo pode de alguma forma estar ligada à melhora da qualidade do produto final.

Somente E6 assinalou melhorar produtos e aumentar competitividade. Esta preocupação pode estar atrelada à sua maior participação no mercado entre as empresas do estudo. Outro fato para explicar as diferentes respostas é que duas empresas não processam alimentos (E1 e E2).

A fonte de informação é outro aspecto de alta relevância no processo inovativo, pois o processo de inovação ocorre pela junção de diferentes fontes de informação. As fontes podem se localizar dentro ou fora da empresa neste processo (LUZ et al., 2009), como já citado.

As fontes de informação apontadas são fontes externas: fornecedores (E1 e E5), concorrentes (E3), centros de pesquisa (E2, E5 e E6), feiras e exposições (E5), laboratórios comerciais (E2); e interna: setores ou departamentos dentro da própria empresa (E2, E4 e E6). Tais fontes de informação já foram apontadas por Luz et al. (2009) em indústrias alimentícias do Estado do Paraná.

A combinação de fontes indicadas pelas empresas é um indicativo importante, pois a habilidade de inovar é influenciada pela capacidade das empresas absorverem e combinarem informações diversas e de fontes internas e externas (SUGAHARA; JANNUZZI, 2005). Além disso, as indústrias que implementam mudanças tecnológicas com a utilização de informações obtidas por fornecedores, clientes, concorrentes, entre outros, possuem a tendência de estarem envolvidas em processos de incorporação e adaptação de tecnologias (LUZ et al., 2009).

Assim, pode-se afirmar que a maioria das empresas deste estudo possui propensão em incorporar e adaptar tecnologias.

Para finalizar, vale ressaltar os fatores e parâmetros fundamentais dos regimes tecnológicos no setor agroindustrial utilizados na pesquisa de Révillion et al. (2004): oportunidade, apropriabilidade e cumulatividade. Dentre esses destaca-se a oportunidade, com maior consonância com a presente pesquisa.

Na oportunidade pode-se observar, de maneira geral, que o nível é alto (por incentivar atividades inovadoras e pela disponibilidade de mercado/aplicações), a difusão é alta (o novo conhecimento pode ser aplicado em vários produtos e mercados) e as fontes são os fornecedores de insumos e equipamentos, as instituições públicas de pesquisa e desenvolvimento ou outros setores.

4.3 FASES DO DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA MOLECULAR

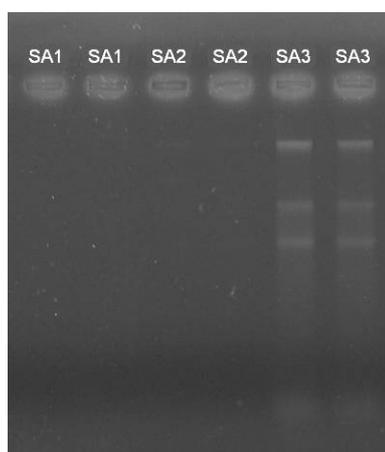
Esta etapa experimental foi desenvolvida para auxiliar a identificação e a caracterização dos fatores limitantes a adoção da tecnologia em relação às particularidades técnicas. Assim, os resultados apresentados estão simulando as dificuldades no desenvolvimento e posteriormente no uso da tecnologia molecular (PCR) na indústria de alimentos.

4.3.1 Etapa de isolamento de DNA

O isolamento de DNA objetiva a obtenção de DNA em quantidade e qualidade. Assim, o DNA deve ser exposto e os demais componentes da célula podem ser eliminados. Para isso, diversos métodos foram desenvolvidos. Os métodos podem diferenciar-se no uso de detergente, enzima, solventes, temperaturas empregadas, entre outros.

A extração de DNA pode ser realizada com kits de extração comerciais elaborados a partir das características de cada amostra. Nesta dissertação, estão sendo apresentados métodos completos, pois também foram desenvolvidos a título de aprendizagem.

Para todos os métodos avaliados fez-se a verificação da qualidade do DNA, realizando-se no mínimo duplicata. A Figura 7, mostra o resultado da visualização de DNA extraído com o método 1.



**Figura 7 - DNA extraído pelo método 1 (SDS, proteinase K, CIA e etanol)
SA1: ATCC 6538P; SA2: ATCC 25923; SA3: *S. aureus* isolado de alimento
Fonte: Aatoria própria, 2013**

Pode-se observar que este método não foi eficiente para todas as amostras. Este fato pode estar associado às condições em que as células se desenvolveram. O isolado de alimento pode ter sofrido modificações na parede celular, por esta ter sido provavelmente exposta a condições adversas, embora também tenha sido repicada e cultivada sob as mesmas condições que as demais para a realização da extração. Gonçalves (2006) cita que o SDS é indicado para lise de paredes celulares

de bactérias Gram-negativas; assim as diferenças intraespécies torna-se um fator a ser estudado.

Nogueira et al. (2004) determinaram que a ausência de bandas definidas em gel de agarose não é fator preditivo para o sucesso da PCR, pois os mesmos obtiveram sucesso na PCR-RAPD com amostras que não apresentaram bandas definidas após extração. Esses destacam ainda que a ausência de visualização está associada à pequena quantidade de DNA. Mas, o intuito no início da pesquisa é a obtenção de quantidade e qualidade para o uso na determinação do protocolo de amplificação. Assim, este método não foi aplicado.

O método 2 é fundamentado essencialmente em agente físico (calor) sem fases de purificação com solventes, pois se faz apenas lise e centrifugação. Dessa forma, não há a desproteínização por solvente orgânico (separação da fase orgânica da aquosa, a qual apresenta DNA), lise enzimática (favorece a separação do DNA) e precipitação do DNA (separa o DNA de outros contaminantes; a precipitação com etanol, por exemplo, promove a remoção de sais que co-precipitam com o DNA) (BITTENCOURT, 2000).

Devido às características mostradas, não foi possível a visualização de bandas no gel de agarose, pois outros componentes da célula (principalmente proteínas) estão presentes na amostra, formando arraste (Figura 8). A qualidade do DNA obtido a partir deste método foi verificada somente com a PCR no item 4.3.3. Entretanto, Mattos (2005) ao utilizar este método constatou que o mesmo não foi eficiente para uma cepa de *S. aureus* recuperada de alimento, do total de 16 cepas.

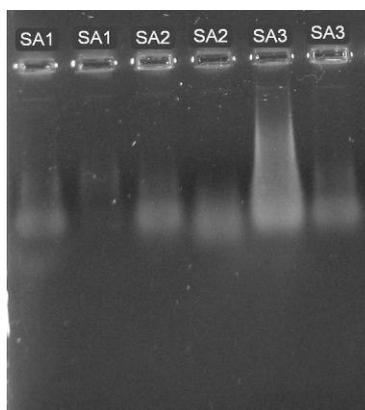
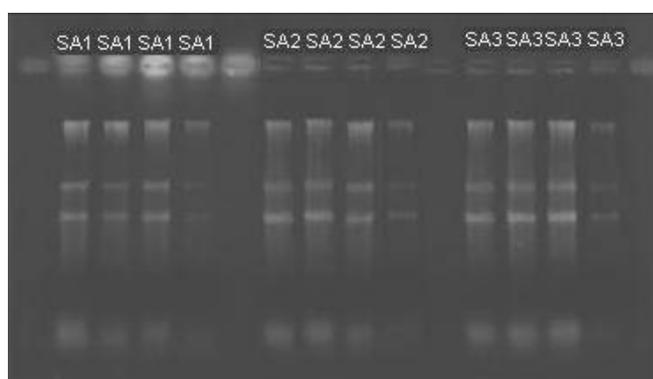


Figura 8 - DNA extraído pelo método 2 (lise térmica)
SA1: ATCC 6538P; SA2: ATCC 25923; SA3: *S. aureus* isolado de alimento
Fonte: Autorial própria, 2013

O método 3, emprega CTAB, componente que desfavorece a ação de enzimas degradantes e de DNAses endógenas, sendo um detergente que solubiliza as membranas, facilitando a precipitação diferencial do complexo formado com o DNA. Além disso, este detergente está associado ao EDTA, composto quelante de cátions, inibindo a ação de DNAses que usam metais como co-fatores (GONÇALVES, 2006).

As extrações com métodos que utilizam este reagente fornecem, geralmente, DNA suficientemente puro para a amplificação por PCR (GONÇALVES, 2006). Observa-se que todas as amostras apresentaram bandas definidas em gel de agarose (Figura 9).



**Figura 9 - DNA extraído pelo método 3 (CTAB, proteinase K, CIA, isopropanol e etanol)
SA1: ATCC 6538P; SA2: ATCC 25923; SA3: *S. aureus* isolado de alimento
Fonte: Autoria própria, 2013**

Os compostos SDS e CTAB geralmente apresentam bons resultados. O protocolo utilizando CTAB apresentou melhor resultado. Em pesquisa, um protocolo que apresenta CTAB também foi melhor quando comparado com SDS 1% para extração de DNA genômico de isolados de *S. aureus* (GONÇALVES, 2006).

O método 4 desenvolvido por Millar et al. (2000) apresenta lise térmica, desproteinização por CIA e precipitação do DNA com etanol, sem envolver etapas com detergentes e enzimas.

Assim, foram visualizadas bandas, mas não definidas (Figura 10). Embora haja desproteinização, ainda ocorre carregamento de proteínas.

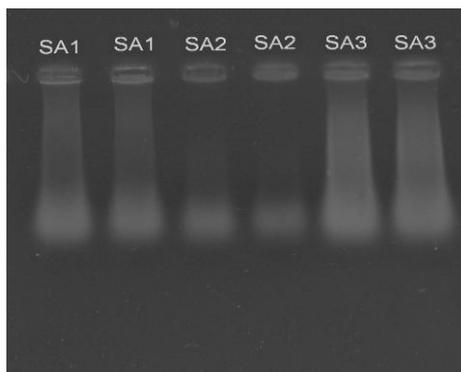


Figura 10 - DNA extraído pelo método 4 (CIA e etanol)
SA1: ATCC 6538P; SA2: ATCC 25923; SA3: *S. aureus* isolado de alimento
Fonte: Autoria própria, 2013

Este protocolo foi aplicado na pesquisa de Dias et al. (2011), em que a extração foi realizada de forma direta da amostra (leite) para identificação de *S. aureus*, como também do potencial enterotoxigênico das cepas. Isso demonstra seu potencial na aplicação em amostras complexas, visto que em muitas pesquisas faz-se o isolamento das cepas para prosseguir com a identificação. Por isso, este método assim como o método 2, será utilizado para amplificação para verificar a qualidade do DNA.

O método 5 apresentou resultados satisfatórios (Figura 11). Porém, faz uso de lisozima (10 mg/L) e proteinase K (5 mg/L). Ressalta-se que o método 3 (com CTAB) apresentou resultados satisfatórios apenas com uso de proteinase K (20 mg/L).

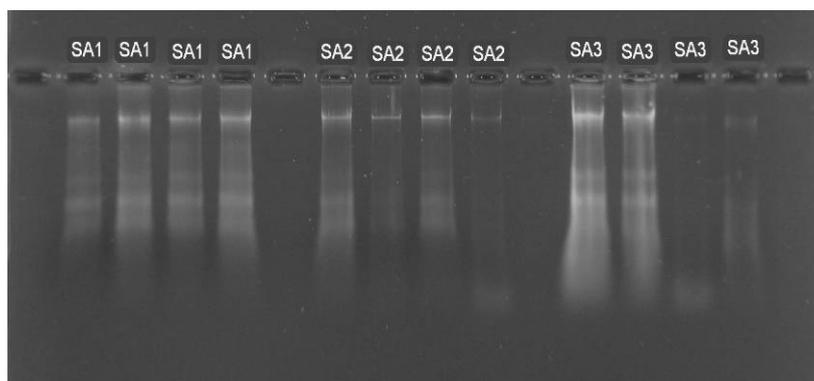


Figura 11 - DNA extraído pelo método 5 (STE, proteinase K, lisozima, CIA, acetato de amônio e isopropanol)
SA1: ATCC 6538P; SA2: ATCC 25923; SA3: *S. aureus* isolado de alimento
Fonte: Autoria própria, 2013

O uso de lisozima é apontado para a extração de cocos Gram-positivos. Pode-se notar que o resultado obtido foi o mais satisfatório por apresentar bandas mais definidas/limpas, porém quanto maior a aplicação de enzimas maior será o custo final (GONÇALVES, 2006).

Entretanto, agregar este custo por amostra traz, conseqüentemente, produtos (DNA's) de maior qualidade, pois o uso de enzimas torna o método mais eficiente devido à ação específica, essencial em determinados casos.

Métodos distintos têm sido descritos devido à variabilidade das células, eficientes para diferentes células sob diferentes condições. Para bactérias, o fator mais discutido na escolha do método de extração é a reação de Gram devido à composição química e estrutural da parede das células (ROSA, 2008).

Bactérias Gram-positivas tendem a apresentar maior resistência ao rompimento da célula e, conseqüentemente, à liberação de DNA por possuírem maior concentração de peptidoglicano na parede celular em relação às Gram-negativas. Entretanto, diferenças intra e interespecies são apontadas como fatores interferentes significativos para a extração de DNA bacteriano (NOGUEIRA et al., 2004), fato que pode explicar o resultado obtido pelo método 1.

Assim, as diferenças protocolares visam solucionar problemas decorrentes de DNAses endógenas, do isolamento de polissacarídeos inibidores de enzimas ou de substâncias que possam danificar o material genético ou inibir a ação da *Taq* polimerase (GONÇALVES, 2006).

Essa necessidade de aplicar diversos métodos na busca pelo ideal pode ser indicada como um limitante devido ao tempo gasto, embora seja de fácil solução em função dos diferentes métodos propostos na literatura.

Além dos motivos apresentados acima, os cinco protocolos de extração de DNA foram testados e adaptados a fim de verificar as dificuldades no desenvolvimento de cada um, considerando tempo de análise (24 horas de enriquecimento e o tempo da extração), uso de enzimas (Quadro 4), qualidade de DNA e sucesso da PCR.

Porém, este último item será discutido somente após a realização da amplificação de DNA.

Método de extração	Tempo de análise (aproximado)	Uso de enzima
1	26 horas e 30 minutos	5 µL proteinase K (20 mg/mL)/ amostra
2	25 hora e 30 minutos	-
3	26 horas e 50 minutos	5 µL proteinase K (20 mg/mL)/ amostra
4	28 horas e 30 minutos	-
5	26 horas e 30 minutos	10µL lisozima (10 mg/mL) e 10µL proteinase K (5 mg/mL)/amostra

Quadro 4 - Características dos métodos de extração de DNA utilizados
Fonte: Aatoria própria, 2013

Quanto ao tempo, pode-se afirmar que é extremamente relevante comparado às etapas iniciais dos métodos convencionais de microbiologia. O uso de enzimas foi citado devido ao custo. Entretanto, o custo por amostra não foi considerado como um obstáculo à realização da análise.

A partir do exposto acima, utilizou-se o DNA obtido das cepas pelo método 3 para a padronização dos protocolos de amplificação de DNA.

De modo geral, os métodos podem ser mencionados como fáceis perante às análises comparadas (microbiológicas convencionais), mas adaptações foram necessárias, quanto ao uso de solventes, ao tempo de centrifugação bem como rotações por minuto e ao tempo de homogeneização.

O desenvolvimento dos métodos de extração foi a etapa mais demorada da fase experimental, podendo o tempo gasto ser um limitante à implantação.

Contudo, na extração de DNA e nas etapas que a compõe não são mostrados obstáculos importantes de ordem técnica, devido às várias alternativas encontradas para seu desenvolvimento e por terem sido empregadas adaptações de fácil implementação, sem o uso de equipamentos onerosos.

4.3.2 Amplificação de DNA e suas dificuldades

A amplificação ocorre a partir da reação biológica com amplificação de regiões do genoma. As regiões estudadas nesta pesquisa correspondem ao gene *coa* e *nuc A*, genes selecionados para detecção de *S. aureus*, responsáveis pela produção de coagulase e termonuclease, respectivamente.

- Amplificação do gene *coa*

A padronização da amplificação da região do gene *coa*, codificador da produção de coagulase foi realizada, em função dessa prova ser utilizada na análise convencional para detectar *S. aureus*, espécie coagulase positiva (MATOS, 2005). Sabe-se que a prova bioquímica convencional pode não detectar a produção de coagulase, pois a proteína pode não estar sendo expressa. Neste sentido, Vieira-da-Motta et al. (2001) realizaram técnicas rotineiras e moleculares para a confirmação de *S. aureus* em leite e os resultados da detecção do gene *coa* apontaram positividade para todas as amostras, enquanto, o teste da coagulase (*coagulase slide test*) revelou variabilidade nos resultados comparado com o diagnóstico molecular.

A avaliação de cepas de *Staphylococcus aureus* revelou que os *primers* *coag2* e *coag3* (mesma sequência utilizada nesta pesquisa) foram específicos para este micro-organismo, pois não houve amplificação quando DNA de outras espécies foram testados (GANDRA, 2003). Uma possibilidade levantada é o uso da PCR para a confirmação de isolados substituindo a confirmação por testes bioquímicos.

A seguir é mostrado o resultado da PCR realizada para a detecção do gene *coa* (Figura 12), fundamentada na reação e na programação de Luz (2008). Essa programação consiste em: 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, gradiente de 50 °C a 61 °C por 2 minutos, 72 °C por 4 minutos; 72 °C por 10 minutos. O gradiente de temperatura (50 °C a 61 °C) é uma função utilizada no termociclador para a verificação da temperatura ideal de hibridização de um dado par de iniciadores.

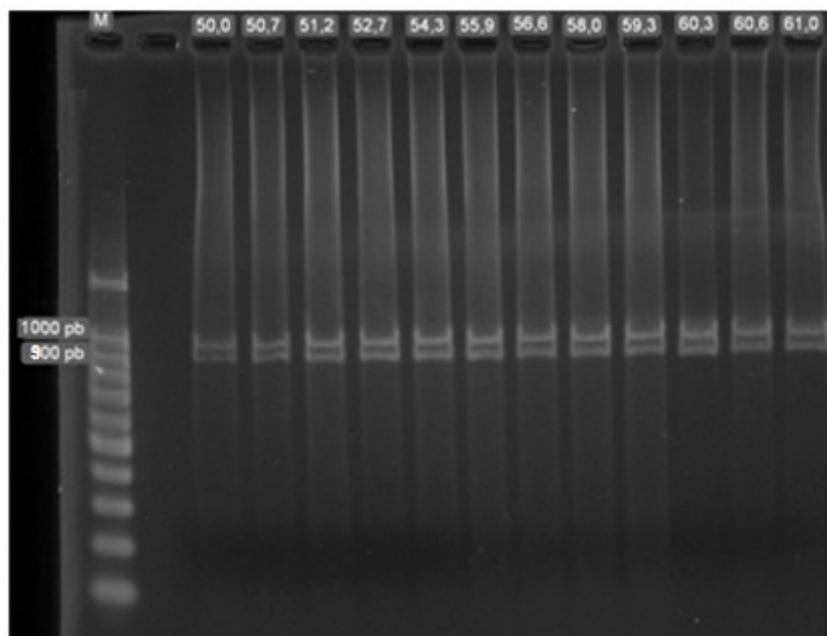


Figura 12 - Amplificação do gene *coa* com gradiente de temperatura
Linha 1: Marcador de peso molecular; Linha 3 a 14: amostra de DNA de *S. aureus* (ATCC 25923)

Fonte: Autoria própria, 2013

O número de pares de bases (pb) indicado é 800 bp, podendo variar para este gene de 612 a 1000 pb, embora Gandra (2003) relate que não há uma faixa “padrão”. Esta variabilidade pode ser decorrente da variabilidade genética da enzima coagulase, demonstrada a existência de polimorfismo (GANDRA, 2003).

O perfil de aproximadamente 1000 pb encontrado foi o mesmo demonstrado por Luz (2008), o qual detectou a presença de dois coagulotipos, de 750 pb e 1000 pb, em *S. aureus* isolados de leite e queijo coalho. Houve a distribuição e predominância dos coagulotipos de acordo com a região onde foram isolados (diferentes municípios). Na mesma pesquisa, determinou-se que os isolados com tais coagulotipos portavam um ou mais genes toxigênicos.

Entretanto, é importante ressaltar a amplificação em todas as temperaturas, fato que pode conduzir ao desenvolvimento de Multiplex PCR, reação em que vários pares de iniciadores podem ser inseridos.

Além da amplificação em todas as temperaturas, ficou evidenciada a amplificação de bandas duplas, característica a ser ajustada para que apenas uma banda nítida seja estabelecida. Este artefato, em alguns casos, deve-se à concentração inadequada de $MgCl_2$. Assim um novo teste foi estabelecido para a para verificar a formação da banda em relação à concentração ideal de Mg (Figura

13) utilizando a temperatura de hibridização em 55 °C. O cloreto de magnésio tem influência direta na reação, pois a íon Mg^{2+} é um cofator indispensável para a atividade/função enzimática (Taq polimerase).

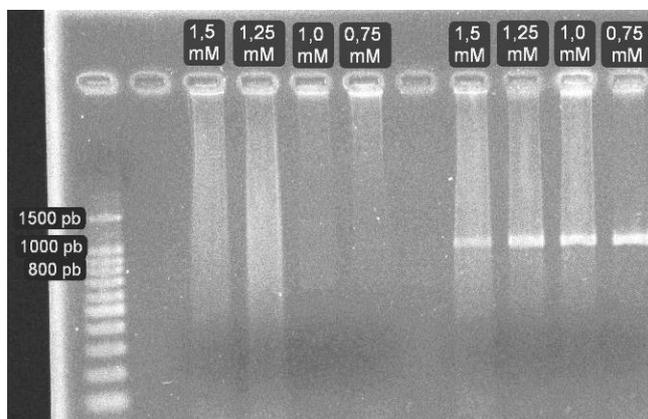


Figura 13 - Amplificação do gene *coa* com diferentes concentrações de $MgCl_2$
 Linha 1: Marcador de peso molecular; Linha 3 a 6: controles negativos; Linha 8 a 11: amostra de DNA de *S. aureus* (ATCC 25923)
 Fonte: Autoria própria, 2013

Com base nos resultados para a amplificação do gene *coa* foi estabelecida a concentração de 0,75 mM de $MgCl_2$ para a melhor visualização da banda. Portanto, as modificações da reação para o gene *coa* consistem na redução da concentração de $MgCl_2$ e a temperatura de hibridização adotada foi de 55 °C, diferente de Luz (2008) que empregou 62 °C, fato associado ao equipamento utilizado. A temperatura de hibridização de 55 °C já foi mencionada em outros trabalhos (KARAHAN; CETINKAYA, 2007; SILVA; SILVA, 2005; VIEIRA-DA-MOTTA et al., 2001).

- Amplificação do gene *nuc A*

O teste da coagulase é padrão para detecção de *S. aureus* e o da termonuclease é utilizado como auxiliar para a discriminação entre *S. aureus* e outras espécies de estafilococos (GANDRA, 2003).

Ressalta-se que estafilococos produtores de enzimas coagulase e termonuclease geralmente estão relacionados com a produção de enterotoxinas (GANDRA, 2003), uma preocupação atual.

Assim, a padronização da amplificação do gene *nuc A* também foi realizada, gene associado à termonuclease (PINTO; CHENOL; AZNAR, 2005; YANG et al.,2007). A temperatura de hibridização foi determinada por meio do gradiente de temperatura (50 °C a 60 °C), com resultados positivos (Figura 14).

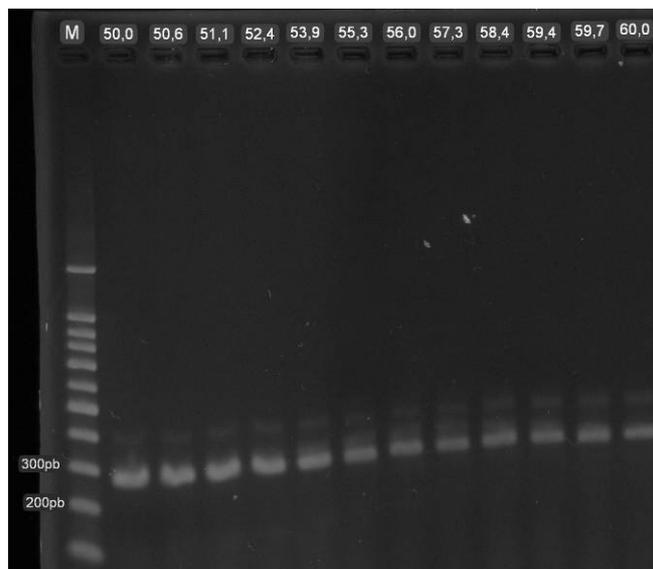


Figura 14 - Amplificação do gene *nuc A* com gradiente de temperatura
Linha 1: Marcador de peso molecular; Linha 2 a 13: amostra de DNA de *S. aureus* (ATCC 25923)
Fonte: Autoria própria, 2013

A programação utilizada foi: 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, gradiente de 50 °C a 60 °C por 45 minutos, 72 °C por 45 segundos; 72 °C por 10 minutos. A reação e a programação base foram obtidas da pesquisa de Pinto, Chenoll e Aznar (2005).

Observando os resultados (produtos com aproximadamente 270 pb) foi estabelecida como temperatura ideal 50 °C. Almeida (2009) também adotou essa temperatura em sua pesquisa.

Pinto, Chenoll e Aznar (2005) avaliaram a detecção deste gene como alternativa ao procedimento convencional. Concluíram ao final da pesquisa que o fragmento amplificado correspondente ao gene *nuc A* foi obtido apenas em estirpes de referência de *S. aureus* e não em estirpes pertencentes a outras espécies de estafilococos, evidenciando o alto nível de especificidade da técnica.

Pode-se concluir neste item que a limitação encontrada não foi a execução da técnica, mas a adequação da reação devido a dependência de profissional especializado. Este limitante foi descrito anteriormente dentro de condicionante técnico, onde é citada a carência de pessoal especializado/ suporte técnico.

4.3.3 Validação do diagnóstico molecular em matriz alimentícia

As amostras analisadas foram embutidos cárneos, alimento extremamente complexo e com alto teor lipídico, o que dificulta a extração de DNA. Alimentos industrializados de bovinos, suínos e aves e seus subprodutos, destacam-se entre os alimentos envolvidos em surtos causados por *S. aureus*.

Estafilococos coagulase positiva são os mais importantes em relação às demais espécies do gênero, pois sua detecção em alimentos indica deficiência de processamento ou condições higiênicas inadequadas, podendo promover intoxicação alimentar (MATTOS, 2005; GANDRA, 2003).

A presença deste micro-organismo nas amostras é esperada por ser um tipo de alimento suscetível e por poder apresentar esfalilococos coagulase positiva até 5×10^3 UFC/g para cárneos maturados e frescos (ANVISA, 2001). Esse indicador substituiu a determinação específica de *S. aureus*, o qual deve ser identificado quando for de interesse de saúde pública.

Assim, iniciou-se a amplificação do gene *coa* em alimentos utilizando a extração por lise térmica (método 2) e a extração citada por Millar et al. (2000) (método 4), métodos selecionados para a realização da PCR devido aos menores custos e também por não exibirem a qualidade de DNA no item 4.3.1. Para a extração, os alimentos foram submetidos à etapa de enriquecimento, seguida da extração, sem o isolamento de colônias como comumente realizado.

A reação foi desenvolvida com sucesso para os dois métodos de extração (Figura 15), sendo a lise térmica selecionada para as demais análises por ser método mais barato, simples, eficaz, rápido e, sobretudo, sem uso de solventes orgânicos altamente contaminantes.

Têm-se na figura abaixo (15) e nas figuras 16 e 17: M – Marcador de peso molecular; CP – Controle Positivo (ATCC 25923); CN – Controle Negativo (Água

deionizada estéril); 1 – Linguiça Frescal; 2 – Linguiça Blumenau; 3 – Linguiça Calabresa; 4 – Linguiça Fina Frescal; 5 – Linguiça Toscana.

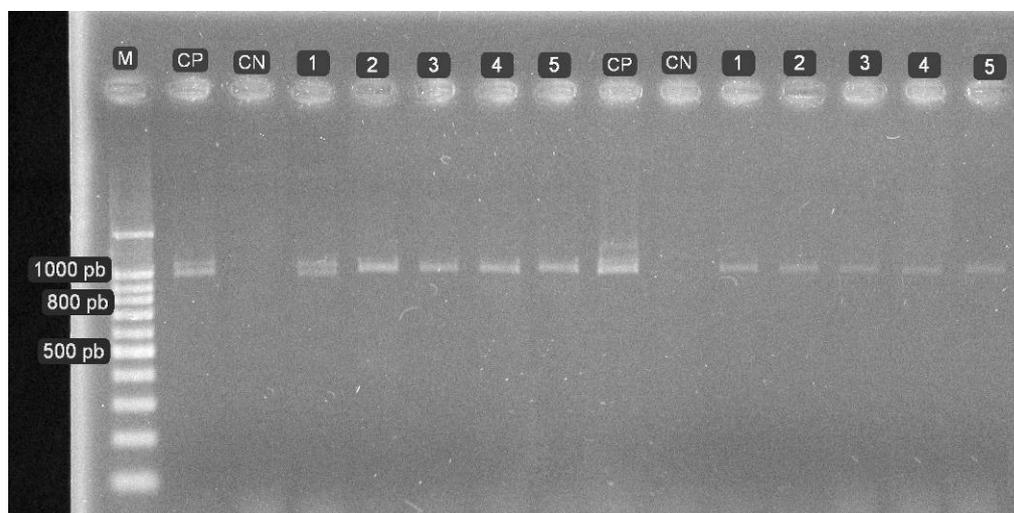


Figura 15 - Amplificação do gene *coa* em amostras alimentícias
M – Marcador de peso molecular; CP – Controle Positivo (ATCC 25923); CN – Controle Negativo (Água deionizada estéril); 1 – Linguiça Frescal; 2 – Linguiça Blumenau; 3 – Linguiça Calabresa; 4 – Linguiça Fina Frescal; 5 – Linguiça Toscana
Extração pelo Método 2 (Linha 2 a 8); Extração pelo Método 4 (Linha 9 a 15)
Fonte: Autoria própria, 2013

O sucesso da PCR (Figura 15) reforça a possibilidade da realização da análise direta em alimentos (sem isolamento de colônias), o que facilita o diagnóstico devido a redução de tempo e trabalho. A detecção dos genes *coa* e *nuc A* são amplamente realizadas em alimentos (SILVA; SILVA, 2005; KARAHAN; CETINKAYA, 2007; VIEIRA-DA-MOTTA et al., 2001; YANG et al., 2007; GANDRA, 2003; ALMEIDA, 2009; ANDRADE, 2008a).

Porém, na maioria das pesquisas, isolados bacterianos são submetidos à extração de DNA.

Além disso, a ausência de enzimas, solventes orgânicos e equipamentos especializados merece destaque na etapa de extração de DNA, pois os reagentes e os equipamentos podem inviabilizar o uso em larga escala de acordo com Zocche (2008).

Procedeu-se também a amplificação do gene *nuc A* (Figura 16). O DNA utilizado foi extraído por meio da lise térmica nas mesmas amostras citadas na reação para *coa*.

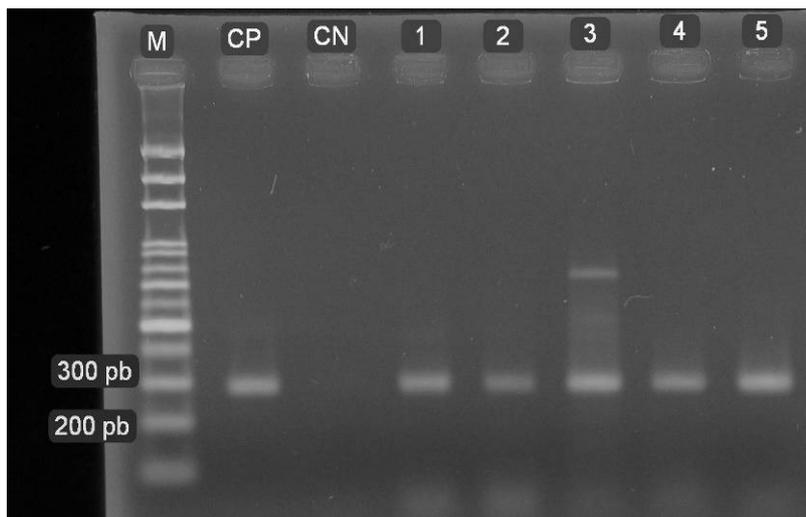


Figura 16 - Amplificação do gene *nuc A* em amostras alimentícias
M – Marcador de peso molecular; CP – Controle Positivo (ATCC 25923); CN – Controle Negativo (Água deionizada estéril); 1 – Linguiça Frescal; 2 – Linguiça Blumenau; 3 – Linguiça Calabresa; 4 – Linguiça Fina Frescal; 5 – Linguiça Toscana
Fonte: Autoria própria, 2013

Os resultados mostram positividade para todas as amostras, confirmando a presença de *S. aureus* como também fornecendo informações sobre seu potencial enterotoxigênico, visto que os genes utilizados são marcadores de contaminação de alimentos com *S. aureus* enterotoxigênicos de acordo com Cremonesi et al. (2005).

Entretanto, observa-se que as condições das reações e das amplificações estão ideais para estas amostras, pois fez-se a repetição da análise com as mesmas amostras e o resultado apresentado foi o idêntico ao inicial.

Com isso, faz-se necessária a verificação destas reações para outras matrizes alimentícias, devido aos componentes presentes em cada alimento. Passo (2009) destaca que amostras alimentícias podem conter contaminantes e enzimas ativas que podem inibir a reação.

Com relação, a otimização da análise indica-se a aplicação em conjunto das reações desenvolvidas separadamente (*coa* e *nuc A*).

Para tanto, faz-se a aplicação dos produtos das reações referentes a mesma amostra num só poço no gel de agarose (Figura 17), com redução consequente de tempo e de material de consumo.

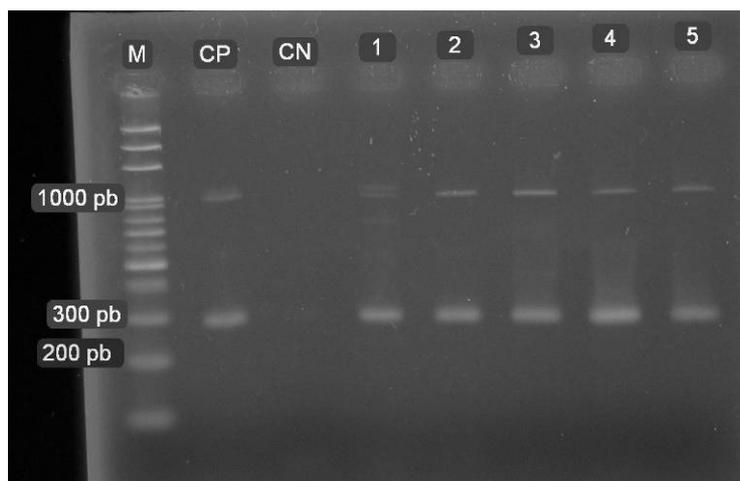


Figura 17 - Visualização da amplificação dos genes *coa* e *nuc A* em amostras alimentícias
M – Marcador de peso molecular; CP – Controle Positivo (ATCC 25923); CN – Controle
Negativo (Água deionizada estéril); 1 – Linguíça Frescal; 2 – Linguíça Blumenau; 3 – Linguíça
Calabresa; 4 – Linguíça Fina Frescal; 5 – Linguíça Toscana
Fonte: Autoria própria, 2013

Também, pode-se realizar *Duplex* PCR, empregando os dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para o mesmo volume de reação. Desta maneira, numa mesma reação faz-se a amplificação de *coa* e *nuc A*. Na presente pesquisa, utilizou-se como referência a reação de Pinto, Chenoll e Aznar (2005) com variação na concentração de $MgCl_2$ (Tabela 2) e a programação de Luz (2008), com temperatura de hibridização/anelamento de 50 °C.

Tabela 2 – Composição da reação Duplex PCR com variação de $MgCl_2$

Componentes	Concentração		
	A	B	C
DNA genômico	Aprox. 40 ng	Aprox. 40 ng	Aprox. 40 ng
Tampão PCR 10x	1x	1x	1x
$MgCl_2$	0,75 mM	1,0 mM	1,5 mM
Oligonucleotídeo iniciador 1 (<i>coa</i>)	1 μ M	1 μ M	1 μ M
Oligonucleotídeo iniciador 2 (<i>coa</i>)	1 μ M	1 μ M	1 μ M
Oligonucleotídeo iniciador 1 (<i>nucA</i>)	1 μ M	1 μ M	1 μ M
Oligonucleotídeo iniciador 2 (<i>nucA</i>)	1 μ M	1 μ M	1 μ M
dNTP's	400 μ M	400 μ M	400 μ M
Taq DNA polimerase	1,5 U	1,5 U	1,5 U
Água deionizada estéril	Volume necessário para completar 25 μ L		

Fonte: Autoria própria, 2013

Foi obtido sucesso nas reações, como mostra Figura 18, desenvolvida com controle positivo ATCC 25923, sendo a reação "A" a melhor por apresentar banda

mais nitidez. Porém, indica-se a aplicação desta reação em amostras de alimentos para sua validação.

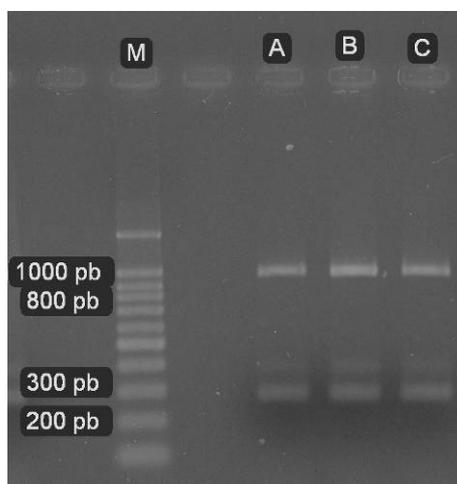


Figura 18 - Duplex PCR

M: Marcador de peso molecular; A: reação com 0,75 mM de MgCl₂;

B: reação com 1,0 mM de MgCl₂; C: reação com 1,5 mM de MgCl₂

Fonte: Autoria própria, 2013

Portanto, a necessidade de ajustes na extração, na padronização e na aplicação em amostras alimentícias pode ser um limitante de ordem técnica, além do gasto de tempo e da imprescindível presença de um profissional especializado para assistências e treinamento dos analistas. Embora não tenham sido indicados limitantes relevantes de ordem técnica neste trabalho, os ajustes quase sempre serão indispensáveis.

Com isso, uma possibilidade para a adoção do diagnóstico molecular é a terceirização da etapa de adaptações no laboratório da empresa, visto que a necessidade de mão de obra altamente qualificada se restringe aos passos iniciais. Essa terceirização não pode ser vista como um limitante em função dos custos, pois a fase dos ajustes da reação é um fator que deve ser explorado para se evitar o desperdício de reagentes, e principalmente garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, já que as reações encontradas na literatura podem ser distintas.

O investimento em treinamento de analistas e/ou dedicação exclusiva destes também pode ser uma alternativa para se evitar um possível entrave.

Após a padronização, a dependência de suporte técnico é reduzida significativamente, tornando viável aos analistas devidamente treinados a execução e interpretação dos resultados.

4.3.4 Comparação entre diagnóstico via PCR e microbiologia convencional aplicados na detecção de patógenos alimentares

As vantagens são grandes incentivos para a adoção das técnicas moleculares. Tang et al. (2009) afirmam que avanços nos exames são necessários e que técnicas rápidas para economizar trabalho, tempo e custo são demanda urgente.

Neste sentido, o diagnóstico molecular via PCR apresenta diversas vantagens em relação às técnicas da microbiologia clássica, sendo: fácil aprendizagem (simplicidade), menos tempo para adquirir as competências, menor custo de materiais, detecção de células viáveis não cultiváveis (VNC), maior especificidade, maior sensibilidade, bom limite de detecção e maior rapidez (PASSO, 2009; TANG et al., 2009; FORSYTHE, 2002, RÜCKERT, 2006; KILLNER, 2008; VALONES et al., 2009; MATIAS, 2008; ANDRADE et al., 2010; FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006., 2006; MAZIERO, 2007; SINGH et al., 2011; GRADY et al., 2008).

O tempo da PCR é uma vantagem de destaque, levando de cinco a vinte e quatro horas para produzir um resultado de detecção (LASCKA et al., 2007; PASSO, 2009). O tempo depende da técnica usada e da inclusão de etapas de enriquecimento, mas ainda assim num prazo de 36 horas é possível obter resultados. Nesta pesquisa, o tempo gasto na análise considerando extração (método 2 – lise térmica) e amplificação em matriz alimentícia foi de aproximadamente 8 horas e 6 horas para os genes *coa* e *nuc A*, respectivamente.

O ganho de tempo também se deve em grande parte ao fato de que a reação pode ser aplicada a amostras com vários espécimes microbianos sem necessidade de isolamento prévio da espécie alvo (RÜCKERT, 2006), como na presente pesquisa.

Quanto ao custo, Teodoro et al. (2006) descreveram que para cada amostra analisada pela PCR, o custo ficou em torno de U\$1,50 e pela análise convencional, U\$ 9,21. Embora, não sejam inclusas nas despesas equipamentos, vidrarias e mão de obra, a diferença é extremamente relevante e significativa para uma indústria processadora de alimentos. Convênios com universidade ou instituições de pesquisas que possuam a tecnologia é uma alternativa para o uso.

A detecção de VNC por meio da PCR representa umas das principais vantagens desse método, se não a principal. O desenvolvimento de VNC ocorre em alguns micro-organismos que, em condições desfavoráveis, mudam suas características de morfologia vibróide para a forma cocóide (VNC) não cultivadas, mesmo em meio seletivo. Tais células mantêm as propriedades de viabilidade e virulência e não são identificadas pelas técnicas tradicionais, representando um perigo à saúde pública (PASSO, 2009; MAZIERO, 2007; BOUFLEUR, 2009; DAMAS; MARASSI, 2010).

A sensibilidade é um aspecto fundamental. Singh et al. (2011) citam em pesquisa que a reação (PCR) para detecção de *Campylobacter jejuni* em fezes e amostras de alimentos foi a mais sensível (96,1%) em relação ao isolamento em cultura (em torno de 80%). Conclusões semelhantes foram mostradas por Rückert (2006), Teodoro et al. (2006) e Maldonado (2008) ao compararem PCR e técnica convencional.

Entretanto, a sensibilidade é variável de acordo com a matriz alimentar devido à presença de inibidores, que podem estar diminuindo a eficiência da amplificação de modo que se faz necessário o enriquecimento da amostra antes da análise (PASSO, 2009; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012).

O enriquecimento aumenta o tempo de análise, uma vez que depende de horas, mas fornece benefícios como diluição dos efeitos dos inibidores e das células não viáveis, multiplicação do micro-organismo alvo e permite a reparação de stress celular (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012; MATIAS, 2008; PASSO, 2009; SUBRAMANIAN et al., 2006; GE; MENG, 2009; GIRONESA et al., 2010).

Existem também kits de extração de DNA, específicos para amostras alimentares, que eliminam inibidores (substâncias que se ligam ou degradam um componente da reação) produzidos por alguns alimentos melhorando assim a técnica (PASSO, 2009), mas neste caso há o aumento de custo por amostra. Os kits são indicados em último caso devido aos diversos protocolos de extração disponíveis.

Uma técnica utilizada para eliminar a desvantagem de detectar células não viáveis consiste na incorporação de propídio monoazídico ou brometo de etídio monoazídico durante as etapas de preparo da amostra. Esses compostos intercalam (penetram) seletivamente no DNA livre (células mortas) e não no DNA das células

vivas intactas, impedindo a amplificação de DNA de células mortas em PCR e qPCR (GE; MENG, 2009; FORSYTHE, 2002; PAULA et al., 2011).

Outra abordagem é a utilização de mRNA ao invés de DNA para a amplificação, já que o mRNA na maioria das bactérias tem uma vida curta (0,5 -2 minutos) (MALORNY et al., 2003), pois a degradação por RNAses endógenas é rápida. A *Reverse Transcriptase* PCR detecta genes especialmente presentes durante as fases de crescimento da bactéria (LASCKA et al., 2007).

Quanto à especificidade, os oligonucleotídeos iniciadores/*primers* (oligonucleotídeo sintético) atuam como uma sequência iniciadora que se une à fita na região em que será alongado o DNA alvo.

Os iniciadores determinam a região do DNA que deverá ser ampliada, pois possuem a sequência conhecida de DNA que permite a detecção de gene no DNA molde. Portanto, são fundamentais para especificidade e sustentabilidade da técnica PCR (SOUZA; BRUSAMARELLO, 2009; MATOS et al., 2005; VIANEZ JUNIOR, 2007; SEADI et al., 2011).

O limite de detecção é baixo (bom) segundo Freitas, Lemos e Marin (2006), padrões internacionais derivados de métodos tradicionais requerem um limiar de detecção de uma célula por 25 gramas de amostra. Entretanto, o limite teórico de detecção uma célula microbiana por reação de PCR pode ser traduzido na prática em 10^3 - 10^4 células por mL de amostra pré-enriquecida. A PCR deve apresentar de 10 a 100 cópias de DNA desejado.

Fácil aprendizagem e menor tempo para adquirir as competências são vantagens citadas por Passo (2009). Porém, ainda há falta de informações a respeito destas. Contudo, na prática é possível verificar que as competências básicas para executar a técnica são adquiridas rapidamente.

4.4 APLICAÇÕES DE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

Diversas são as técnicas moleculares aplicáveis na indústria de alimentos, dentre as quais pode-se citar: PCR, *Multiplex* PCR (mPCR), *Real Time* PCR (qPCR), *Bax® System Real Time PCR Assay* (para diversos micro-organismos, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter (coli, jejuni e lari)*, *Staphylococcus*

aureus, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*), Ribotipagem (usado para tipificação de bactérias, existe disponível o *Riboprinter® System*), *Reverse Transcriptase PCR* (GANDRA et al., 2008; DUPONT, 2012), além de muitas outras.

Observa-se que a PCR revolucionou as análises moleculares, mas ainda na legislação vigente brasileira (BRASIL, 2003) sobre “Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água”, métodos moleculares são indicados quando os testes convencionais apresentarem resultados duvidosos.

Porém, instruções normativas regulamentam o uso de ensaios de PCR, são citados como parte dos padrões oficiais de análise microbiológica de alimentos. Instruções normativas regulamentam ensaios *Bax® System*, para a detecção de *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 2004; BRASIL, 2012; BRASIL, 2005), fato que pode impulsionar seu uso nos próximos anos devido as vantagens que apresentam para as empresas do setor. As instruções indicam os procedimentos descritos pelo USDA (*United State Department of Agriculture*)/FSIS (*Food Safety and Inspection Service*).

A RDC 12 (ANVISA, 2001), indica órgãos internacionais reconhecidos (citação descrita no item 4.2.1), os quais apresentam PCR e técnicas fundamentadas em PCR com reações já padronizadas, por exemplo, para *Vibrio cholerae* no BAM (*Bacteriological Analytical Manual*) da *Food and Drug Administration*.

Muitas vezes a falta do uso de diagnóstico molecular pode estar associado à falta de conhecimento dos padrões internacionais, visto que nestes as técnicas moleculares são indicadas tornando seu uso uma prática comum sendo, portanto, aplicável na indústria.

5 CONCLUSÃO

Foi possível caracterizar os fatores limitantes à adoção da inovação de processo proposta. Com isso, pode-se estar auxiliando na introdução desta nas empresas, que poderão obter ganhos, principalmente com o aumento da confiabilidade no controle de seus processos, além da possibilidade de interação entre empresa, universidade e governo.

Assim, a legislação brasileira é apontada como um fator, por não estabelecer critérios técnicos detalhados, estando ainda focada em métodos clássicos, demorados e trabalhosos. Desta forma, as empresas também estão focadas nesses métodos, apenas uma empresa de grande porte menciona o uso de tecnologia molecular.

Outro fator apontado foi a falta de conhecimento dos gestores, em destaque a empresa E2. As respostas apontam prováveis falhas na busca e/ou absorção por informação a respeito.

Quanto aos recursos humanos, observou-se que nas empresas estudadas há a disponibilidade de profissionais capazes de absorverem as competências necessárias para a aplicação de técnicas moleculares. Porém, quanto aos recursos financeiros existem entraves devido ao custo da implantação. O custo de manutenção não é dispendioso devendo ser considerado e o retorno do investimento pode ser previsto relacionando os custos da análise por amostra que será extremamente reduzido.

A percepção dos gestores em relação às técnicas moleculares foi, de modo geral, positiva havendo interesse em participar de cursos de capacitação em tecnologia molecular e adotar técnicas moleculares. As motivações para adoção de novos métodos indicadas são reais para o mercado no qual estão inseridos.

Em relação aos fatores limitantes inerentes a técnica proposta, é possível destacar a necessidade de tempo para os ajustes na extração de DNA e na padronização da reação, como também a necessidade da assistência de profissional especializada para a adequação da técnica e treinamento dos analistas. Estes fatores foram evidenciados no levantamento das etapas necessárias para o ajuste de um diagnóstico molecular e na validação deste em matriz alimentícia.

As dificuldades encontradas na extração de DNA foram superadas, pois há um grande número de métodos disponíveis. Na padronização, ajustes são na maioria dos casos indispensáveis, entretanto, as adaptações realizadas nesta pesquisa foram de fácil execução.

Quanto a aplicação da PCR nas amostras alimentícias utilizadas, não houve complexidade quanto a presença de inibidores. No entanto, indica-se para trabalhos futuros testar a extração direta em outras amostras e validar *Duplex* PCR em amostras de alimentos.

Dentre os diagnósticos moleculares aplicáveis na indústria, Bax® System é destaque, por ser um método rápido e de fácil execução e por estar contemplado em legislação brasileira específica.

Contudo, pode-se afirmar que os principais limitantes são a falta de conhecimento, a legislação brasileira, a falta de recursos financeiros, a necessidade de profissional capacitado para auxiliar no desenvolvimento do diagnóstico molecular e o tempo gasto para os ajustes recomendados, corroborando alguns dos possíveis limitantes apontados.

Espera-se que tais limitantes sejam superados para que a inovação biotecnológica mostrada seja adotada pelas empresas do ramo alimentício. A legislação vigente é um importante aliado neste processo, sendo um dos incentivos de maior impacto para a inserção de tecnologias no setor. Além disso, poderia haver a redução de custos na padronização se a mesma disponibilizasse protocolos padronizados.

Com a PCR, as empresas serão favorecidas por meio do aumento da credibilidade, rapidez na emissão de laudos e na liberação de lotes de alimentos e principalmente por estar oferecendo alimentos submetidos a uma técnica sofisticada que assegura alimentos inócuos.

REFERÊNCIAS

ABgene. **PCR Masters Mixes.** Disponível em: < http://www.abgene.com/Static_Pages.asp?page=49 >. Acesso em: 12 mai 2012.

ABREU, A. de. **Esforço para inovação tecnológica:** uma caracterização da indústria de alimentos município de Marília/SP. 2007. 189f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, T. C. R. M. de. Detecção rápida de *Salmonella* Enteritidis em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 401-408, 2003.

ALMEIDA, M. R. **A eficiência dos investimentos do programa de inovação tecnológica em pequenas empresas: uma integração da análise envoltória de dados e índice de Mamquist.** 2010. 273f. Tese (Doutorado em Engenharia da Produção) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

ALMEIDA, L. M. **Fatores de virulência e genes regulatórios de agr de *Staphylococcus* e outras espécies coagulases positivas isoladas de mastites bovina e ovina.** 2009. 111f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALVES-MAZZOTTI, A. J.; GEWANDSZNAJER, F. **O método nas ciências naturais e sociais:** pesquisa quantitativa e qualitativa. 2 ed. São Paulo: Thomson, 2004.

ANDERSEN, J. K. New strategies for the use of microbiological examinations in food control in Denmark. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 227-277, 2007.

ANDRADE, R. B. et. al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 741-750, 2010.

ANDRADE, M. A. **Tipagem molecular e investigação de genes toxigênicos em *staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas.** 2008. 128f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008a.

ANDRADE, R. R. de. **Identificação microbiológica e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. por análise de restrição de fragmentos de PCR (RFLP-PCR) em amostras de carnes e derivados no Distrito Federal.** 2008. 61f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

ANVISA. **RDC 12 de 2 de janeiro de 2001.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 19 jun. 2011.

ARORA, K.; CHAND S.; MALHOTRA, B. D. Recent developments in bio-molecular electronics techniques for food pathogens. **Analytica Chimica Acta**, v. 569, *issue* 1-2, p. 259-274, 2006.

ARORA, P. et al. Biosensor as innovative tools for the detection of food borne pathogens. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, n. 1, p. 1-12, 2011.

ARRUDA, G. A. **Perfil fenotípico de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos: análise crítica das técnicas de PCR e PFGE e importância para a saúde pública.** 2006. 117f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ASSIS, D. M. L.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos. **Revista da Universidade do Vale do Rio Verde**, v. 9, n.2, p. 344-355, 2011.

ATOBE, J. H. **Amplificação de DNA de *Neisseria meningitidis* em amostras de líquido cefalorraquidiano empregando a reação da polimerase- multiplex.** 1998. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BARDON, J. et. al. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in broilers at retail in the Czech Republic and their antibiotic resistance. **Food Control**, v. 22, p. 328-332, 2011.

BATALHA, M. O. et al. **Introdução à engenharia da produção.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

BENETTI, T. M. **Métodos de detecção e incidência de *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. em lingüiças resfriadas comercializadas no Estado do Paraná.** 2009. 135f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade Genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. 2000. 58f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

BOUFLEUR, R. ***Campylobacter jejuni* em frangos de corte, carne e vísceras no Rio Grande do Sul e efeito do congelamento sobre a contaminação nos cortes**. 2009. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 – MAPA**. Disponível: <
<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851> >. Acesso em: 19 jun. 2011.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 41 de 7 de junho de 2004 – MAPA**. Disponível em: <
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtopDF&tipo=INM&numeroAto=00000041&seqAto=000&valorAno=2004&orgao=SDA/MAA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>> >. Acesso em: 20 jan. 2012.

BRASIL. **DOC SAC/CGAL nº 04 - Escopo da área de microbiologia em alimentos e água - MAPA**. Disponível em: <
<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/laboratorios/laboratorios-por-area-de-analise/microbiologia-em-alimentos-e-agua>>. Acesso em: 12 dez. 2012b.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 40 de 12 de dezembro de 2005 – MAPA**. Disponível em: <
<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=15177>>. Acesso em: 12 dez. 2012c.

BRAUN, S.; HADWIGE, K. Knowledge transfer from research to industry (SMEs) e an example from the food sector. **Trends in Food Science & Technology**, p. 1-7, 2011.

CABRAL, J. E. de O. Determinantes da propensão para inovar e da intensidade inovativa em empresas da indústria de alimentos do Brasil. **Revista de Administração Contemporânea**, v. 11, n. 4, p. 87-108, 2007.

CARVALHO, A. F. de. **Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva (CDT) em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolados de frangos de corte e hortaliças**. 2009. 56f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Instituto Paulista, 2009.

CASARIL, K. B. P. B. **Padronização de PCR tradicional e PCR em tempo real para detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em alimentos**. 2010. 101f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

CASSOLI, L. D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. 2005. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CESCO, M. A. de O. **Pesquisa de fatores associados a virulência de *Salmonella Hadar* através da reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CHAPAVAL, L. et al. Aplicação da técnica de REP-PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha para o monitoramento da qualidade do leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.3, p.309-320, 2006.

CHAPMAN, P. A. et al. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detection Escherichia coli O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **Food Microbiology**, v. 68, p.11-20, 2001.

CONCEIÇÃO, J. C. P. R. **Radiografia da indústria de alimentos no Brasil: identificação dos principais fatores referentes à exportação, inovação e ao food safety**. Disponível em: <
http://www.ipea.gov.br/sites/000/2/publicacoes/tds/td_1303.pdf >. Acesso em: 01 set. 2011.

CONDE, M. V. F.; ARAÚJO-JORGE, T. C. de. Modelos e concepções de inovação: a transição de paradigmas, a reforma da C & T brasileira e as concepções de gestores de uma instituição pública de pesquisa em saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 3, p. 727-741, 2003.

CORTEZ, A. L. L. **Disseminação de bactérias do gênero *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves**. 2006. 97 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade de São Paulo, Jaboticabal, 2006.

CREMONESI, P. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, n. 19, p. 299-305, 2005.

CRIBB, A. Y. Determinantes da transferência de tecnologia na agroindústria brasileira de alimentos: identificação e caracterização. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 4, n. 3, p. 89-100, 2009.

DAMAS, T. M. T.; MARASSI, A. E. *Campyloacter* sp.: agente etiológico de doença de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, v. 24, n. 180/181, p. 85-90, 2010.

DIAS, N. L. et al. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n.6, p. 1547-1552, 2011.

DRAGONE, G. et al. Produção de cerveja: microrganismos deteriorantes e métodos de detecção. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 4, p. 240-251, 2007.

DUPONT. **Bax® System PCR assay**. Disponível em: <http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/products/BAX_System/bax_salmonella.html>. Acesso em: 02 set. 2011.

DUPONT. **RiboPrinter® System**. Disponível em: <http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/products/RiboPrinter_System/>. Acesso em: 12 dez. 2012.

FERREIRA, I. M. **Riscos relacionados à contaminação microbiana de carne moída bovina**. 2008. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

FIGUEIREDO, E. E. de S. et al. Detecção do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* no Leite pela Reação em Cadeia da Polimerase Seguida de Análise de Restrição do Fragmento Amplificado (PRA). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1023-1033, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **BAM: Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens.** Disponível em : <<http://www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanualbam/ucm109652.htm>>. Acesso em 10 jan. 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2002. Trad. Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt.

FRANCHIN, P. R. et al. Comparison of the BAX® System with an In-House MSRV method for the detection of Salmonella in chicken carcasses and pork. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 521-526, 2006.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2004.

FREITAS, E. I.; LEMOS, A. A. de; MARIN, V. A. Validação de métodos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 1073-1083, 2006.

FURTADO, R. F. et al. **Aplicações de biossensores na análise de qualidade de alimentos – EMBRAPA 2008.** Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_117.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2012.

GANDRA, E. Á. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de seqüências dos genes *coa* e *nuc*.** 2003. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

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**, v. 60, n. 5, p. 1241-1249, 2008.

GE, B.; MENG, J. Advanced technologies for pathogen and toxin detection in foods: current applications and future directions. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 14, p. 235-241, 2009.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4 ed. São Paulo: Atlas, 2002.

GIRONESA, R. et al. Molecular detection of pathogens in water – the pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v. 44, n. 15, p. 4325-4339, 2010.

GONÇALVES, D. **Caracterização molecular de isolados de *Staphylococcus aureus* e produção de marcadores genéticos para diagnóstico de mastite em bovinos leiteiros**. 2006. 137f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GRADY, J. et. al. Rapid real time PCR detection *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 75-84, 2008.

IBGE. **Agroindústria Brasileira cresceu em 2010**. Disponível em: <http://www.ibge.com.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1818&id_pagina=1&titulo=Agroindustria-brasileira-cresceu-4,7%-em-2010>. Acesso em: 20 jun. 2011.

IPARDES. **Workshop: identificação de gargalos tecnológicos na agroindústria paranaense**. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/webis.docs/seti_gargalos_tec_agroindustria_workshop_resultados_2005.pdf>. Acesso em 01 set. 2011.

IVNITSKI, D. et al. Biosensors for detection of pathogens bacteria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, n. 7, p. 599-624, 1999.

JORDÃO Jr. C. M. et al. Padronização da técnica de PCR na detecção de *Mycobacterium bovis* diretamente no leite. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p., 51-55, 2005.

KARAHAN, M.; CETINKAYA, B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 428-431, 2007.

KILLNER, M. **Paralelo entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para a detecção de *Salmonella* spp. em matrizes alimentares sem contaminação experimental**: avaliação em condições reais e simultâneas de uso. 2008. 168f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LABIAK JR, S.; MATOS, E. A. de; LIMA, I. S. **Fontes de fomento à inovação**. Curitiba: Aymar, 2011.

LAZCKA, O. et al. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. **Food Control**, v. 22, *issue* 7, p. 1205-1217, 2007.

LEE, J. Y. et al. Miniaturization of polymerase Chain Reaction. **Biotechnology & Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 213-220, 2003.

LI, Y. et al. Determination of foodborne pathogenic bacteria by multiplex PCR-microchip capillary electrophoresis with genetic algorithm-support vector regression optimization. **Analytica Chimica Acta**, v. 643, p. 100-107, 2009.

LOPES-MIELGOA, N.; MONTES-PIONB, J. M.; VAZQUEZ-ORDÁSB, C. J. Are quality and innovation management conflicting activities?. **Technovation**, v. 29, *issue* 8, p. 537-545, 2009.

LUZ, I. S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho na região em municípios da região agreste de Pernambuco**. 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2008.

LUZ, L. M. da et al. Importância das fontes de informação para a inovação tecnológica na indústria de alimentos do Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, XXIX, 2009, Salvador. **Anais...** Disponível em: <<http://pg.utfpr.edu.br/dirppg/ppgep/ebook/2009/CONGRESSOS/Nacionais/2009%20-%20enegep/2.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

MACÊDO, N. M. M. N.; BARROS, R. A.; CÂNDIDO, G. A. Avaliação do processo de aprendizado e compartilhamento de conhecimento: um estudo exploratório de uma empresa agroindustrial. **Informação & Sociedade: Estudos**, João Pessoa, Vol. 20, n. 1, p. 111-127, 2010.

MACKIW, E.; POPOWSKI, J.; SZPONAR, L. Thermotolerant *Campylobacter* spp. – Report on monitoring studies performed in 2004–2005 in Poland. **Food Control**, v.19, p. 219-222, 2008.

MALDONADO, A. G. **Ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: uma análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase - PCR.** 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 39-48, 2003.

MAÑAS, V. A. **Gestão da tecnologia e inovação.** São Paulo: Érica, 2001.

MARCONI, M. de A.; LAKATOS, E. M. **Fundamentos de metodologia científica.** 4. ed. São Paulo: Atlas, 2001.

MASSA, S.; TESTA, S. A knowledge management approach to organizational competitive advantage: Evidence from the food sector. **European Management Journal**, Vol. 27, p. 129-141, 2009.

MATIAS, B. G. **Contaminação microbiana de carcaças de frangos obtidas em dois sistemas de abate e avaliação de um protocolo de reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção de *Salmonella* spp..** 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade de Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MATOS, L. L. de et al. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. **Arquivos Médicos do Abc**, v. 01, n. 30, p.19-25, 2005.

MATTOS, E. C. de. **Caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos, mãos de manipuladores e veiculadas por formigas.** 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MAZIERO, M. T. **Contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter jejuni* antes e após armazenamento sob resfriamento ou congelamento.** 2007. 56f.

Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

MILLAR, B. C. et al. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. **Journal of Microbiology Methods**, v. 42, p. 139-147, 2000.

MONTE, L. F. V. **Detecção de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina por meio de multiplex PCR em amostras de secreção respiratória de pacientes com fibrose cística**. 2005. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MOREIRA, M., et al. Methodological variations in the isolation of genomic from *Streptococcus* bacteria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53, n.4, p.845-849, 2010.

MOREIRA, H.; CALEFFE, L. G. **Metodologia para o professor pesquisador**. 2 ed. Rio de Janeiro: Lamparina, 2008.

MORESCO, V. **Detecção de Rotavírus em amostras de águas de superfície através de técnicas moleculares e de cultivo celular**. 2008. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MOURA, C. S. et al. **Avaliação do sistema BAX® frente ao método da ISO para detecção de *Enterobacter sakazakii* em alimentos**. Disponível em: < <http://iac.impulsa.com.br/areadoinstituto/pibic/anais/2008/Artigos/RE0801027.pdf> >. Acesso em: 02 set. 2011.

NATUME, Rosane Y. **Diagnóstico da gestão da inovação nas indústrias de alimentos de Ponta Grossa**. 2007. 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2007.

NOGUEIRA, C. A. M. et al. Desempenho de Kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 6, n. 2, 2004.

OCDE. **Manual De Oslo**: diretrizes para coleta e interpretação de dados sobre inovação. 3 ed. Tradução FINEP, 2005.

OLSEN, J. E. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. **Food Research Internacional**, v. 33, p. 257-266, 2000.

PAMUK, S.; AKGUN, S. Detection of thermophilic *Campylobacter* sp. In unpacked broiler carcasses in retail markets of Afyonkarahisar and confirmation *C. jejuni* isolates using PCR. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8 issue 10, p. 2063-2068, 2009.

PASSO, M. do C. S. U. da C. **Avaliação de métodos moleculares para avaliação da qualidade e da segurança microbiológicas em produtos alimentares**. 2009. 53f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

PAULA, R. A. de. et al. **Uso de brometo de etídeo monoazida e PCR em tempo real para detecção de células viáveis de *Listeria monocytogenes***. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/577770/1/uso.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

PERES, N. D. **Detecção de *Listeria monocytogenes* em leite: sensibilidade e especificidade da técnica de reação em cadeia da polimerase**. 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PILATTI, L. A.; PEDROSO, B.; GUTIERREZ, G. L. Propriedades psicométricas de instrumentos de avaliação: um debate necessário. **Revista Brasileira do Ensino de Ciência e Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 81-91, 2010.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 340-352, 2005.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 848-861, 2011.

REIS, D. R. dos. **Gestão da inovação tecnológica**. 2 ed. Barueri: Manole, 2008.

RÉVILLION, J. P. P. et al. Estudo do processo de inovação tecnológica no setor agroindustrial – estudos de caso da cadeia produtiva de leite fluido no sistema setorial de inovação da França. **Revista de Administração Contemporânea**, v. 8, n. 3, p.75-98, 2004.

ROCHA, S. L. da S. **Detecção de fatores de virulência em amostras de *E. coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do multiplex PCR.** 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ROSA, D. D. Método rápido de detecção de bactérias. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 259-261, 2008.

RÜCKERT, D. A. S. V. **Comparação dos métodos microbiológicos convencional, imunoenálise e reação de polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* sp. em frangos durante o abate.** 2006. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SAMBROOK, RITSCH and MANIATIS. **Molecular Cloning A Laboratory Manual**, 2 Ed. Cold Spring Habor Laboratory Press, 1989.

SEADI, C. F. et al. **Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas.** Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v38n2/a09v38n2.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2011.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Dados epidemiológicos- DTA período de 2000 a 2011.** Disponível em:< http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf >. Acesso em: 20 abr. 2012.

SENAI. **Rotas estratégicas para o futuro da indústria paranaense: roadmapping da indústria agroalimentar – 2015.** Curitiba: SENAI/PR, 2007.

SILVA, E. L. da; MENEZES, E. M. **Metodologia da pesquisa e elaboração de dissertação.** 4 ed. Florianópolis: UFSC, 2005.

SILVA, W. P. da et al. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 103-106, 2000.

SILVA, E. R. da, SILVA, N. da. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 260-264, 2005.

SINGH, H. et al. Comparative analysis of cultural isolation and PCR based assay for detection of *Campylobacter jejuni* in food and faecal samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 181-186, 2011.

SOUZA, A. L. F. de; BRUSAMARELLO, L. C. C. **Sequenciamento de dna: decifrando o manual de instruções dos seres vivos**. Genética Na Escola, Ribeirão Preto, p.45-52, 2009. Disponível em: <http://geneticanaescola.com.br/ano4vol1/MS19_009.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2011.

SUBRAMANIAN, S. B. et al. Virulent gene based DNA probe for the detection of pathogenic *Bacillus cereus* strains found in food. **Process Biochemistry**, v. 41, *issue* 4, p.783-788, 2006.

SUGAHARA, C. R.; JANUZZI, P. M. Estudo do uso de informação para a inovação tecnológica na indústria brasileira. **Ciência da Informação**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 45-56, 2005.

TANG, Y. et al. Rapid detection techniques for biological and chemical contamination in food: A review. **Internacional Journal of Food Engineering**, v.5, *issue* 4, p.1-13 2009.

TEODORO, V. A. M. et al. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, 9-14, fev. 2006.

TIGRE, P. B. **Gestão da Inovação**: a economia da tecnologia no Brasil. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

UEPG. **Os Campos Gerais do Paraná**. Disponível em: <http://www.uepg.br/dicion/campos_gerais.htm>. Acesso em: 10 mai. 2011.

VALONES, M. A. A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 1-11, jan./mar. 2009.

VIANEZ JUNIOR, João Lídio da Silva Gonçalves. **Bioinformática aplicada no desenho de indicadores para genes funcionais**: degradação de herbicida 2,4-D: estudo de caso. Disponível em: <<http://www.lbsbm.microbiologia.ufrj.br/PAGINA%20EM%20PORTUGUES/DOWN>>

OAD /INTERNA%20TESES/tesejoao/disserta%C3%A7%C3%A3omestrado.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2011.

VIEIRA-DA-MOTTA, O. et al. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.1, p. 27-31, 2001.

YANG, Y. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by Polimerase Chain Reaction Assay. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n.7, p. 857-862, 2007.

ZOCHE, F. **Identificação de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas A, B, C2 e D por Multiplex-PCR e Elisa Indireto**. 2005. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

ZOCHE, F. ***Staphylococcus aureus* enterotoxogênicos: PCR para detecção de queijo Minas Frescal e caracterização do grupamento *egc* em isolados de alimentos de origem animal**. 2008. 108f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas, 2008.

ZOCHE, F. et al. **PCR Multiplex para detecção de *staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil**. Disponível em: <
http://www.scielo.org.br/scielo.php?pid=S0378-18442009000700008&script=sci_arttext >. Acesso em: 14 dez. 2011.

APÊNDICE A – Questionário de pesquisa



Pesquisa sobre Inovação no Controle de Qualidade em Alimentos

Pesquisadora: Marjory Xavier Rodrigues

Esta pesquisa está sendo desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção da UTFPR-PG, com o intuito de analisar os fatores limitantes à adoção de tecnologias moleculares aplicadas na análise de alimentos.

Comprometemo-nos em manter a identificação de sua empresa em sigilo e as informações cedidas serão utilizadas somente para fim científico.

INFORMAÇÕES PRELIMINARES

Empresa:

Nome:

Profissão:

e-mail:

Data:

QUESTIONÁRIO

1. Quais os diagnósticos de rotina realizados no laboratório de microbiologia?

2. Quais as técnicas de detecção utilizadas?

- Etapas de pré-enriquecimento
- Etapa de enriquecimento seletivo
- Semeadura em meio sólido seletivo-diferencial
- Identificação bioquímica e sorológica das colônias suspeitas
- Métodos Imunológicos (testes imunoenzimáticos)
- Técnicas de imunocaptura
- Métodos de biologia molecular
- Outra. Especifique: _____.

3. Qual o microrganismo patogênico de mais difícil detecção com os métodos utilizados em seu laboratório?
4. Dentre os microrganismos não contemplados nas análises de rotina, qual seria o indicado para o desenvolvimento de análise de rotina?
- () *Clostridium* sp.
() *Escherichia coli* O157:H7
() *Bacillus cereus*
() *Listeria monocytogenes*
() *Salmonella* sp.
() *Vibrio cholerae*
() *Campylobacter* sp.
() Outro. Especifique:_____.
5. A empresa realiza pesquisa na área de análise microbiológica de alimentos?
- () Sim () Não
- Se sim, a pesquisa é somente interna ou com parcerias?_____.
6. A empresa consulta regularmente artigos científicos, revistas, sites, etc., relacionados às tecnologias analíticas?
- () Sim () Não
- Se não, qual o principal fator: () Falta de tempo () Não há interesse
() Acesso a periódicos () Outro. Especifique:_____.
7. A empresa vê com bons olhos as parcerias com centros de pesquisa para implementar tecnologias?
- () Sim () Não
8. Você possui conhecimento a respeito de tecnologias moleculares para a detecção de microrganismos?
- () Sim () Não
9. Você possui interesse em curso de capacitação em tecnologia molecular?
- () Sim () Não
- Se sim, qual a carga horária () 12h () 20h () 40h
- 9.1 Qual a principal motivação para ingressar num curso de tecnologia molecular?
- () interesse técnico () utilização na rotina
() acessar possível terceirização do diagnóstico
() Outro. Especifique:_____.

10. Para implementar tecnologias moleculares como parte do processo de garantia da qualidade, haveria disponibilidade de recursos humanos?
- Sim Não
11. A empresa possui disponibilidade financeira para capacitar funcionários em tecnologia molecular?
- Sim Não
12. Adotaria o diagnóstico molecular na rotina do laboratório?
- Sim Não
- Se sim, Implantaria Terceirizaria
13. Qual a sua visão sobre a inserção da biotecnologia molecular (análise de DNA) na indústria de alimentos como auxiliar no controle microbiológico?
14. Você acredita que a inovação nas análises realizadas no laboratório auxilia na credibilidade da empresa e do controle de qualidade?
- Sim Não
15. A empresa possui disponibilidade financeira para implementar laboratórios para tecnologias moleculares?
- Sim Não
16. Quais seriam as principais motivações para a adoção de tecnologia molecular?
- custo
 tempo de análise
 sensibilidade
 praticidade
 especificidade
 confiabilidade
17. A relação custo-benefício/tempo é levada em consideração quando adota-se métodos analíticos?
- Sim Não
18. A legislação vigente na área em que atua é o principal fator que leva a inovação nos processos analíticos?
- Sim Não
19. Quais as principais fontes de informação utilizada para a adoção de novos métodos?
- Fornecedores
 Concorrentes

- Centro de pesquisas/Universidades
- Consultores
- Feiras e exposições
- Setores ou departamentos dentro da própria empresa
- Laboratórios comerciais

20. Com qual frequência ocorre a busca por novas tecnologias para análise de alimentos:

- Nunca
- Raramente
- Às vezes, quando achamos necessário
- Frequentemente

21. As inovações são geralmente implementadas na empresa para:

- Sanar problemas
- Otimizar processo
- Melhorar de produto
- Reduzir perdas
- Aumentar competitividade

22. Como é a estrutura organizacional da área de controle de qualidade microbiológica?

Nº de funcionários:

Formação específica de cada funcionário:

Agradeço a Colaboração!

ANEXO A – Métodos de extração de DNA

Método de extração 1

O primeiro protocolo testado foi adaptado de Moreira et al. (2010). Homogeneizou-se o meio de cultura, sendo transferido para tubo tipo eppendorf, sendo então submetido à centrifugação (13000 rpm/1 minuto) para a formação de precipitado. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se 600 µL de tampão de extração (SDS 1% – dodecil sulfato de sódio). Em seguida, promoveu-se agitação em vortex de bandeja por 5 minutos com adição de 5 µL de proteinase K (20 mg/mL), assim os eppendorfs foram incubados em banho seco por 30 minutos à 65 °C.

Após a incubação adicionou-se 700 µL de CIA (24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico), seguida da agitação em vortex de bandeja por 5 minutos e centrifugação (7 minutos à 13000 rpm). Nesta fase há formação de sobrenadante, transferido para novo eppendorf sobre o qual acrescentou-se 200 µL de tampão de extração e 650 µL de CIA. Os eppendorfs foram agitados por 5 minutos e centrifugados a 13000 rpm por 7 minutos. Realizou-se a transferência do sobrenadante para novo eppendorf com 650 µL de CIA, sendo realizada a agitação e centrifugação sob as condições citadas anteriormente. As fases de transferência de sobrenadante, adição de CIA, agitação e centrifugação foi repetida.

Ao sobrenadante transferido para novo eppendorf, adicionou-se 1 mL de etanol 96 %. Os eppendorfs foram homogeneizados por inversão e centrifugados por 3 minutos a 13000 rpm. Retirou-se o álcool e o pellet secou em temperatura ambiente por cerca de 15 minutos, após secagem o pellet foi ressuspensão em 100 µL de TE (Tris-HCl pH 8,0; EDTA pH 8,0).

Método de extração 2

O método do Choque Térmico foi realizado conforme Chapman et al. (2001), sendo também descrito como Lise Térmica ou Fervura (*Boiling*).

Neste método realiza-se a centrifugação do meio de cultura já homogeneizado, descarte do sobrenadante e ressuspensão do precipitado em 1mL de água ultra pura.

A suspensão resultante, conforme citado acima, foi centrifugada por 3 minutos a 12000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspensão em 200 µL de água ultra pura. Realizou-se

homogeneização e seguiu-se para aquecimento a 95 °C por 10 minutos. Após aquecimento, os eppendorfs foram congelados a -20 °C por 30 minutos e em seguida foram mantidos a 65 °C por 1 minuto.

Uma centrifugação final foi realizada a 12000 rpm por 10 minutos. Nesta etapa, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novo eppendorf, o qual foi mantido a -20 °C até o momento do uso. Porém, é indicado que o DNA extraído por este método seja utilizado o mais rápido possível.

Método de extração 3

O método 3 foi proposto por Chapaval et al. (2006). Neste caso, a população bacteriana foi transferida para eppendorf, com centrifugação por 3 minutos a 14.000 rpm (repetida até obtenção de precipitado). O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se 700 µL de tampão de extração CTAB 2% (1,4M NaCl; Tris-Hcl pH 8,0; EDTA pH 8,0; CTAB 2% (brometo de cetiltrimetilamônio)) e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL).

A solução foi homogeneizada em vortex e incubada a 65 °C por 30 minutos (a cada 10 minutos a solução foi homogeneizada sem movimentos bruscos). Após incubação foi adicionado 650 µL de CIA. Essa mistura foi homogeneizada até formação de emulsão, a qual foi centrifugada a 14000 rpm por 7 minutos. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para novo microtubo com 200 µL de CTAB 2%. Repetiu-se a homogeneização e adicionou-se 650 µL de CIA. A solução foi homogeneizada novamente e centrifugada a 14000 rpm por 7 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo eppendorf. O processo com CIA foi repetido por mais duas vezes.

Ao sobrenadante resultante adicionou-se 1 volume de isopropanol em temperatura ambiente. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados por 7 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi então removido e o precipitado foi lavado duas vezes com 70 µL de etanol 70% (a cada lavagem o precipitado foi centrifugado a 14000 rpm por 2 minutos). O pellet secou em temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida foi ressuspenso em 40 µL de TE e deixado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos, após a incubação foi armazenado a - 20 °C.

Método de extração 4

O método descrito por Millar et al. (2000) adaptado foi desenvolvido iniciando com a centrifugação (13000 rpm por 10 minutos) do meio de cultura.

Ao pellet obtido adicionou-se 1 mL de Tris-HCl (pH 8,0) e foi realizada homogeneização em vortex de bandeja por 5 minutos e centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de TE, sendo homogeneizado em vortex por 5 minutos em seguida fez-se aquecimento por 2 horas a 96 °C em banho seco.

Após aquecimento, adicionou-se 100 µL de CIA e homogeneizou-se em vortex por 10 segundos e nova centrifugação foi realizada a 2.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo eppendorf e a etapa de extração com CIA foi repetida mais duas vezes, sendo que na última utilizou-se apenas clorofórmio.

Ao sobrenadante transferido para novo eppendorf adicionou-se etanol 95% (duas vezes o volume inicial). Esta solução foi mantida por 1 hora a – 70 °C, para precipitação do DNA.

Após precipitação do DNA, foi realizada centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 500 µL de etanol 70%, com homogeneização por inversão. Repetiu-se a centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado para a secagem do pellet por cerca de 20 minutos.

O precipitado foi então ressuspenso em 20 µL de tampão TE e finalmente armazenado a – 20 °C até a sua utilização.

Método de extração 5

Realizou-se centrifugação inicial (14000 rpm por 5 minutos) do meio de cultura e homogeneizou-se o sedimento em 500 µL de tampão TE 10:1, juntamente com 10 µL de lisozima (10 mg/L) e 10 µL de proteinase K (5 mg/L). A mistura foi incubada a 60 °C por 20 minutos. Após a incubação adicionou-se 100 µL de tampão STE (2,5% SDS, 10 mM Tris-HCl, 0,25 M EDTA) e as amostras foram incubadas novamente, por 15 minutos à mesma temperatura. Em seguida, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente (5 minutos) e em gelo (5 minutos). Assim, a

reação foi neutralizada com 130 μL de acetato de amônio 7,5 M e mantida em gelo por mais 15 minutos.

A seguir, procedeu-se a centrifugação (14000 rpm por 5 minutos) e transferiu-se aproximadamente 700 μL de sobrenadante para novo tubo, sendo adicionado o mesmo volume de CIA. Então homogeneizaram-se as amostras e foram repetidas a centrifugação e a transferência do sobrenadante para novo tubo. Ao sobrenadante foi adicionado 420 μL de isopropanol e deixaram-se os tubos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Em seguida, realizou-se centrifugação e o descarte do sobrenadante. Ao precipitado adicionou-se 10 μL de água deionizada estéril. O DNA foi mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esse método foi realizado de acordo com Luz (2008).