

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas

**Qualidade microbiológica de produtos de origem animal e águas
provenientes de estabelecimentos do estado do Rio Grande do Sul.**

Melina Krug

Orientadora: Prof. Dr^a Ana Paula Guedes Frazzon
Co-orientadora: Msc.^a Fernanda Marques de Souza Godinho

Porto Alegre
2018

MELINA KRUG

**Qualidade microbiológica de produtos de origem animal e águas
provenientes de estabelecimentos do estado do Rio Grande do Sul**

Trabalho de Conclusão apresentado à
Comissão de Graduação do curso de
Ciências Biológicas – Bacharelado da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial e obrigatório
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jeverson Frazzon. ICTA/UFRGS

Dr^a. Michele Mann- PosDoc UFRGS

Porto Alegre, Junho 2018.

Manuscrito formatado conforme as
normas editoriais da
Revista Brasileira de Biociências.

Qualidade microbiológica de produtos de origem animal e águas provenientes de estabelecimentos do estado do Rio Grande do Sul

Melina Krug^{1*}, Ana Paula Guedes Frazzon¹ e Fernanda Marques de Souza Godinho^{1,2}.

Qualidade microbiológica de Produtos e Águas do RS.

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Rua Sarmento Leite 500, Farroupilha CEP 90035-190, Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Fundação de Ciência e Tecnologia (CIENTEC). Rua Washington Luiz 675, prédio 8, Centro Histórico, CEP 90010-460, Porto Alegre, RS, Brasil.

* melinakrug@gmail.com.br

RESUMO: (Qualidade microbiológica de produtos de origem animal e águas provenientes de estabelecimentos do estado do Rio Grande do Sul). O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade-sanitária de produtos cárneos, lácteos e águas provenientes do estado do Rio Grande do Sul. No presente estudo foram avaliados dados microbiológicos de 2.498 amostras de produtos cárneos e lácteos e 593 amostras de água, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC durante o período de dezembro de 2015 a junho de 2016. Foram avaliados os parâmetros pra coliformes a 45 °C, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, Clostrídio sulfito redutores a 46 °C e bactérias heterotróficas. Os microrganismos predominantes nas amostras analisadas de origem animal eram do grupo dos coliformes, sendo que 1,7 % dos produtos cárneos analisados estavam impróprios para consumo e 5,8 % dos produtos lácteos analisados não apresentaram condições satisfatórias para consumo. Em relação a *Salmonella*, este gênero estava presente em 0,6 % dos produtos cárneos, e ausente em todos os produtos lácteos. Todas as amostras apresentaram-se em conformidade para *S. aureus* e Clostrídio sulfito redutores a 46 °C. Do total de águas analisadas 6,4 % das amostras apresentaram contagem de bactérias heterotróficas acima do limite estabelecido, 2,0 % apresentaram coliformes totais e 0,3 % apresentaram-se impróprias para consumo com resultado positivo para *Escherichia coli*. Considerando os resultados, ressalta-se uma melhoria nas qualidades higiênico-sanitárias durante o processo de produção de alimentos, a fim de diminuir a contaminação por coliformes termotolerantes nos produtos finais.

Palavras-chave: alimentos, água, qualidade microbiológica, alimentos seguros.

ABSTRACT: (Microbiological quality of animal origin products and water from Rio Grande do Sul establishments) The objective of this work was to evaluate the sanitary quality of meat and dairy products and water from Rio Grande do Sul state. The present study evaluated microbiological data from 2,498 samples of meat and dairy products and 593 samples of water, at the Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC during the period of December, 2015 to June, 2016. The parameters for Coliforms at 45 °C, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, Clostridium sulfite reductants at 46 °C and heterotrophic bacteria were evaluated. The predominant microorganisms in the analysed samples of animal origin were the coliforms group, where 1.7% of meat products analysed was unfit for consumption and 5.8% of the dairy products are not in satisfactory conditions for consumption. The *Salmonella* genus was present in 0.6% of meat products, and absent in all dairy products. All samples were in accordance to *S. aureus* and Clostridium sulfite reducers at 46 °C. Of the total water analyzed, 6.4% of samples showed heterotrophic count bacteria above to the established limit, 2.0% showed total coliforms and 0.3% were unfit for consumption, with positive results to *Escherichia coli*. Considering the results, it should be noted an improvement in hygienic-sanitary qualities during the process of food production, in order to reduce contamination by coliforms termotolerantes into final products.

Key-words: food, water, microbiological quality, safe food.

INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos além de fornecer um produto que tenha a qualidade esperada pelo consumidor também deve produzir um alimento que seja seguro, ou seja, que não apresente risco à saúde do consumidor (Forsythe 2002). Uma das formas de determinar se o alimento está próprio para o consumo é a inspeção por órgãos governamentais ou pela própria indústria. Essa inspeção é realizada pelo meio de testes físicos, químicos e microbiológicos no produto final, a fim de verificar se o produto está de acordo com a legislação vigente, (Sousa 2006).

O controle sanitário na área de alimentos visa a proteção à saúde da população, para isso a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina as legislações sanitárias de alimentos. No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da ANVISA, estabelece os padrões microbiológicos para os alimentos em geral, sendo esta a referência nacional para a avaliação das condições microbiológicas de alimentos no Brasil (Brasil 2001).

O controle sanitário na área de alimentos visa a proteção a saúde da população, para isso a ANVISA determina as legislação sanitárias de alimentos. A água é uma fonte natural essencial para a sobrevivência do ser humano e demais seres vivos e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) todas as pessoas têm o direito ao acesso à água potável e segura e que não represente risco algum à saúde.

De acordo com a portaria de consolidação n.º 5, de 3 de outubro de 2017, Anexo XX da (ANVISA) que estabelece a qualidade da água para consumo e uso no preparo de alimentos assim como o conceito de água potável, sob o ponto de vista microbiológico, a água deve estar na seguinte conformidade: ausência de coliformes totais e termotolerantes em

100 mL de amostra e a contagem de bactérias heterotróficas não deve ultrapassar 500 UFC/mL (Brasil 2017).

Além da água, os alimentos fornecem nutrientes essenciais para os seres humanos, e há uma constante preocupação em consumir alimentos seguros, com o intuito de garantir a qualidade dos alimentos a indústria adota programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF). As BPF podem ser definidas como um conjunto de procedimentos que devem ser seguidos pelos estabelecimentos que produzem, manipulam ou comercializam alimentos, com o objetivo de garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos alimentos com a legislação (Brasil 2004). No Brasil, as BPF são regidas pelas portarias 1428/93-MS e 326/97-SVS/MS e pela resolução 275/2002 – RDC que são fiscalizados pela ANVISA. A implantação de programas de BPF podem vir a promover a segurança alimentar aos consumidores e conseqüentemente ajudar a diminuir a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), (Van Amsom *et al.* 2000).

Atualmente as DTAs são consideradas um problema de saúde pública. Estas DTAs são doenças causadas por microrganismos patogênicos (infecciosos ou toxigênicos) que penetram no organismo humano por meio de ingestão de água e alimentos contaminados (Welken *et al.* 2009). Dentre as bactérias que podem levar a ocorrência de DTAs as mais comumente relacionadas são: *Escherichia coli*, a *Salmonella*, o *Staphylococcus aureus* e o *Clostridium perfringens* (Ministério da Saúde/ SVS).

No grupo dos coliformes totais (ou a 35 °C) estão às bactérias em forma de bastonete Gram-negativas, não esporuladas, aeróbias ou anaeróbias facultativas capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 24 h às 48 h a 35 °C. Já os coliformes termotolerantes (ou seja a 45 °C), diferem dos coliformes a 35 °C, pois são bactérias que fermentam a lactose quando incubadas na temperatura de 44-45 °C. Dentro do grupo dos coliformes

termotolerantes, a *E. coli* é a bactéria indicadora de contaminação fecal em alimentos, pois tem como seu habitat o trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente (Silva 1997). Este microrganismo pode provocar cólica, febre, diarreia, calafrios, mal estar, e às vezes quadro de diarreia com sangramento (Barbosa *et al.* 2009).

A *Salmonella* spp., membro da família Enterobacteriaceae, é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete, não esporulada, anaeróbia facultativa, que pode fermentar a glicose produzindo ácido e gás, e não metaboliza lactose e sacarose (Jay 2005). Dentre as espécies de *Salmonella*, a *Salmonella enteritidis* é a principal causadora de salmonelose, cujos sintomas são febre, cólicas abdominais e diarreia, de 12 a 72 horas após consumo do alimento contaminado (Forsythe 2002). A *Salmonella* foi o principal agente etiológico envolvido em surtos confirmados de DTA no RS entre os anos 2000 a 2014, em sua maioria devido à ingestão de ovos crus usados na preparação da maionese caseira (DVE/CEVS/RS).

Entre as bactérias Gram-positivas associadas à DTAs, estão o *Staphylococcus aureus* e o *Clostridium perfringens*. Os *S. aureus* são caracterizados por apresentarem a morfologia celular na forma de cocos-agrupados. Entre 40 a 50 % da população, esta espécie pode fazer parte da microbiota da pele e mucosas, sendo estes classificados como portadores assintomáticos. Entretanto pode provocar infecção em humanos como, furúnculos, pneumonia, meningite, endocardite, e em animais como o gado leiteiro, mastite, Stamford *et al.* (2006). Algumas cepas podem expressar enterotoxinas a serem responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica, devido à ingestão da enterotoxina produzida pela bactéria durante o crescimento em alimentos contaminados (Ferreira *et al.* 2010). O *S. aureus* foi o segundo agente etiológico identificado em surtos alimentares no RS entre os anos 2000 a 2014. Sendo nos anos de 2012 e 2014 o principal agente, superando o número de casos envolvendo salmonelose (DVE/CEVS/RS).

Outra bactéria Gram-positiva importante nos alimentos é o gênero *Clostridium*. Os Clostrídios sulfito redutores são bactérias em forma de bastonetes, esporulados, anaeróbios que são capazes de reduzir o sulfito a sulfeto de hidrogênio (H₂S) a 46 °C. São membros da microbiota do trato intestinal do homem e animais (Mendes *et al.* 2010) e entre as espécies deste gênero, destacam-se o *C. perfringens* que é responsável pela gangrena venosa e várias enterites e o *C. botulinum* responsável pelo botulismo uma doença neuro paralisante causada por alimentos contaminados pela toxina botulínica produzida pelo microrganismo (Ferreira *et al.* 2010; Novais 2010). Entre os anos 2000 e 2014 *C. botulinum* teve 1 registro no Estado e enquanto *C. perfringens* teve 16 registros (DVE/CEVS/RS).

Devido a importância do fornecimento de alimentos seguros e o atendimento às legislações vigentes, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a qualidade sanitária de amostras de alimentos e águas provenientes de estabelecimentos do estado do Rio Grande do Sul recebidas no Laboratório de Microbiologia da Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC. Para essas amostras foram avaliados os seguintes parâmetros: coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp., *S. aureus*, clostrídios sulfito redutores a 46 °C e bactérias heterotróficas. A partir destes resultados, buscou-se avaliar qual a ocorrência e frequência de produtos próprios e impróprios para o consumo humano entre alimentos e águas, conforme as normas RDC n° 12 e portaria n° 5 de 3 outubro de 2017 do Ministério da Saúde.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram avaliados dados de 2.498 amostras de produtos de origem animal, incluindo produtos cárneos e lácteos, 593 amostras de água, provenientes de diferentes estabelecimentos comerciais do Rio Grande do Sul (RS), durante o período de

dezembro de 2015 a junho de 2016 no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC. Os produtos são oriundos de coletas do serviço de fiscalização pela Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA (antigo CISPOA), um órgão da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul responsável pela inspeção de produtos de origem animal que são comercializados dentro do Estado do RS.

Dentre as 2.498 amostras de alimentos, 1.956 são produtos cárneos (carne *in natura*, linguiças frescas, salames e fiambres), 23 gordura animal (banha) e 519 produtos lácteos (leite, queijos e iogurtes).

As amostras foram transportadas e mantidas no laboratório sob refrigeração até o momento da análise. Atendendo ao preconizado na legislação, as amostras de água foram analisadas no período de até 24 h após coleta.

A preparação das amostras de alimentos iniciou-se pela pesagem em condições assépticas seguida da diluição em água peptonada tamponada a 0,1 %. Para as análises de *S. aureus*, coliformes a 45 °C e clostrídios sulfito redutores a 46 °C foram utilizadas alíquotas de 10 g ou mL em 90 mL de água peptonada. Para a análise de *Salmonella* spp. foram pesadas 25 g ou mL e diluídos em 225 mL de água peptonada.

Para as análises de água, volumes de 100 mL de cada amostra foram filtrados em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm com auxílio de equipamento Manifold.

Em pesquisa de *Salmonella* spp. foi utilizado o método ensaio imunológico com revelação fluorescente (ELFA - *Enzyme Linked Fluorescent Assay*), conforme descrito na AOAC (*Official Methods of Analysis*). Foi realizado um pré-enriquecimento em água

peptonada, incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Após esse período foi retirando $0,1\text{ }\mu\text{L}$ da amostra hidratada e transferido para o caldo *Salmonella* Xpress (SX2), incubado por mais 24 h em banho-maria a $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram coletados $0,5\text{ }\mu\text{L}$ em barretes padrão para o método VIDAS[®] SLM. Realizou-se o ensaio imunoenzimático pelo equipamento. Os resultados foram obtidos aproximadamente em 45 minutos. O resultado foi expresso em presença ou ausência de *Salmonella spp.* em 25 g/mL do alimento.

A análise de *Staphylococcus aureus* foi realizada pela técnica de espalhamento em superfície (*spread-plate*) no ágar Baird-Parker (BP) suplementado com gema de ovo e telurito. Após enriquecimento em água peptonada, $0,1\text{ }\mu\text{L}$ foi inoculado no meio e dispersado com a alça de Drigalski em placas de Petri contendo ágar BP. O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. A contagem de colônias foi baseada nas características presuntivas típicas das colônias no meio (como: formas circulares, colorações pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por um halo transparente). Para confirmação de colônias típicas foi realizado o teste da enzima coagulase, para qual foram selecionadas cinco colônias e transferidas para um tubo contendo de caldo infusão cérebro coração (BHI). Após incubação a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h foi transferido $0,3\text{ mL}$ da cada cultivo em BHI para tubos estéreis contendo $0,3\text{ mL}$ de plasma de coelho e incubados novamente a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por, pelo menos, 6 h e para verificação da presença de coágulos. A prova é considerando positiva para *S. aureus* quando há formação de coágulos e a prova negativa quando não há formação de coágulos.

A determinação da presença de clostrídios sulfito redutores a $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi feita através da técnica de plaqueamento em profundidade (*pour-plate*). Após enriquecimento com a água peptonada, 1 mL da suspensão inicial foi inoculado em uma placa estéril sem meio. A placa foi preenchida com 10 a 15 mL do ágar *Clostridium Perfringens* (TSC - *Tryptose Sulphite*

Cycloserine), homogeneizada em movimentos circulares e aguardada a solidificação. Sobre a primeira camada, uma segunda camada de 10 mL foi vertida e deixada solidificar. Os ensaios foram realizados em duplicata. As placas foram armazenadas em jarras de anaerobiose com gerador adequado e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $20\text{ h} \pm 2\text{ h}$. A contagem de colônias foi baseada nas características presuntivas típicas das colônias no meio como coloração (pretas e de tamanho variável 1 a 3 mm). O cálculo do número de colônias foi determinado pela média da soma de colônias típicas no meio multiplicado pelo fator de diluição usado.

Para análise de coliformes $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ em alimentos foram utilizados dois métodos:

Para produtos cárneos, foi realizado o plaqueamento em profundidade (*pour-plate*) em ágar bile vermelho violeta lactose (VRBL - *Violet Red Bile Lactose*). Após enriquecimento em água peptonada tamponada, transferiu-se 1 mL da suspensão em uma placa estéril sem meio. Na mesma placa foram vertidos de 10 a 15 mL do ágar VRBL, misturado em movimentos circulares e aguardado a solidificação, uma sobrecamada de 10 mL foi vertida sob o mesmo ágar e deixada solidificar. As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

Em produtos lácteos, foi empregado o método dos tubos múltiplos (Número mais provável – NMP). No teste presuntivo foi inoculado 10 mL da amostra em três tubos (com tubos de Durham invertido no seu interior) de caldo Lauryl Sulfato Triptose (dupla concentração), e inoculados 1 mL, 0,1 mL e 0,01 mL da amostra em séries de três tubos (com tubos de Durham invertido em seu interior) de caldo Lauryl Sulfato Triptose (concentração normal). Os tubos foram incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Para o teste confirmativo de coliformes totais uma alíquota de cada tubo positivo (com formação de gás e meio turvo) foi transferida para tubos contendo caldo lactosado - bile verde brilhante (VB), e incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Para o teste confirmatório de coliformes a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ uma alíquota de cada tubo positivo foi transferida para tubos contendo caldo EC (*Escherichia coli*) e incubados a $44,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h

utilizando o banho-maria. Foram considerados tubos positivos aqueles com formação de gás e meio turvo. Foi utilizada a tabela de NMP para verificar qual o número mais provável de coliformes totais e termotolerantes por grama ou mL.

Nas amostras de água foram utilizadas as metodologias descritas no “*Standard Methods of Water and Wastewater*” (APHA). A quantificação dos coliformes e *E. coli* foi realizada através da técnica da membrana filtrante onde volumes de 100 mL de cada amostra foram filtrados em membranas com porosidade de 0,45µm e depositadas em placas contendo ágar m-Endo. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Os resultados foram expressos em unidade formadora de colônia (UFC) por 100 mL de amostra (UFC/mL).

A quantificação das bactérias heterotróficas foi determinada através da técnica de plaqueamento em profundidade (*pour-plate*) em Agar Reasoner’s 2A (R2A). Foi semeado 1 mL da amostra em placas, com volume de diluição correspondente e vertido 10 a 15 mL do ágar R2A, em duplicata. Incubadas a 35° C ±1° C por 48 h. As colônias foram contadas e os valores expressos em UFC/mL.

O levantamento dos dados foi realizado manualmente através dos laudos de análise microbiológica emitidos, com a posterior tabulação desses resultados em software Excel. (v.2010) no qual foi aplicada uma análise descritiva para obtenção do percentual de positividade das amostras para *Salmonella* spp., *S. aureus*, clostrídios sulfito redutores, coliformes termotolerantes e bactérias heterotróficas mesófilas.

Os parâmetros limites das análises microbiológicas realizadas em laboratório seguiram as normas da RDC nº12 de acordo com a característica de cada alimento, e portaria nº 5, 3 de outubro de 2017 do Ministério da Saúde para a água.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Referente as 3.091 amostras analisadas, 27,6 % eram oriundas da região metropolitana de Porto Alegre, 21,7 % da região Noroeste Rio-grandense, 21,4 % da região Nordeste Rio-grandense, 13,5 % da região Centro Oriental, 10,5 % da região Sudeste, 3,2 % da região Sudoeste e 2,1% da região Centro Ocidental conforme figura 1.

Os dados observados no estudo são coerentes com a base de produção das mesorregiões: a região metropolitana é fortemente influenciada pelo setor industrial, sendo as mais significativas o setor calçadista, o petroquímico e o de alimentos. A mesorregião Noroeste Rio-grandense conta com o setor pecuário de pequenos animais (suíno e aves). A mesorregião Nordeste Rio-grandense desenvolveu perfil diversificado na agropecuária tais como: suinocultura, pecuária de leite e vitivinicultura. Centro Oriental contribui com setor estatal (Universidade e Base aérea). Centro Oriental com setor da agroindústria fortemente baseada na lavoura de fumo. O Sudoeste Rio-grandense possui a estrutura de grandes latifúndios já estagnada. O Sudeste Rio-grandense com predomínio da indústria têxtil e infraestrutura portuária (Mammarella 2010).

Entre os microrganismos analisados nas amostras de alimentos a contaminação mais frequentemente relacionada foi a presença dos coliformes termotolerantes. Para os produtos cárneos, das 1.956 amostras, 1.030 foram analisadas para este parâmetro conforme figura 2, sendo que destas, 759 (73,7 %) estavam próprias para consumo (contagem $<0,3$ NMP/g ou $<1,0 \times 10$ UFC/g), 253 (24,6 %) em condições satisfatórias para consumo (contagem menor que o limite da legislação) e 18 (1,7 %) estavam impróprias para consumo.

Dentre as 18 amostras impróprias para o consumo, as linguiças a base de carne suína e os cortes de frango tiveram maior frequência.

Os resultados observados no presente estudo são inferiores quando comparado aos estudos realizados por Dias *et al.* (2008), onde 7,0 % das amostras de embutidos frescos comercializados na região sul do RS estavam contaminadas com coliformes termotolerantes, sendo duas de carne suína e uma de carne de frango. Moreira *et al.* (2001) encontraram *E. coli* em todos os pontos amostrados da linha de processamento de linguiça mista, desde a matéria-prima (carne bovina e suína), superfícies de equipamentos e utensílios, mãos de manipuladores até condimentos, inclusive no produto final. Indicando más condições de higiene, de limpeza e sanitárias durante o processo. Carnes cruas e frangos são os alimentos mais comuns implicados em surtos de *E. coli* enteropatogênica, que causa diarreias, febre, náuseas e vômitos (Oliveira 2011).

Dentre os 519 produtos lácteos, 515 foram analisados para este parâmetro de acordo com figura 2, sendo que 338 (65,6 %) estavam próprias para consumo (contagem <0,3 NMP/g), 147 (28,5 %) estavam em condições satisfatórias para consumo (contagem menor que o limite da legislação) e 30 (5,8 %) estavam impróprias para consumo.

Entre os trinta produtos lácteos contaminados estavam queijos, natas, iogurtes, ricotas e manteiga. Bastos *et al.* (2001) sugerem como as principais causas de contaminação do leite e derivados são: i) a pouca higienização no momento da ordenha, ii) o armazenamento inadequado e iii) a constante manipulação desses produtos. Muitas vezes a presença de coliformes no leite, falhas no processo de pasteurização, uso de leite não pasteurizado ou contaminação durante o processo de produção, resultam em um queijo de baixa qualidade sanitária, (Scheid *et al.* 2004).

Dos 227 queijos analisados, 11 (4,8 %) estavam impróprios. Adami *et al.* (2015) avaliando queijos no Vale do Rio Taquari – RS, observaram resultados superiores aos do presente estudo, onde 41,7 % das suas amostras apresentaram-se impróprias para consumo.

Assim como das 102 amostras de natas (creme de leite) analisadas, 9 (8,8 %) estavam impróprias, que também demonstra um resultado inferior ao observado no estudo de Czechowski *et al.* (2016) que analisaram creme de leite (Nata) no Norte do Estado – RS e detectaram que (33,3 %) das suas amostras apresentaram-se impróprias para consumo neste parâmetro.

Quanto a presença de *Salmonella* spp. nas amostras de produtos cárneos avaliadas, 1.818 foram testadas para este parâmetro, sendo que destes 1.807 (99,4 %) apresentaram resultados satisfatórios (ausência em 25 g), e 11 (0,6 %) apresentaram-se impróprias para o consumo (presença em 25g) conforme figura 3, constituindo em sua maioria linguiças de carne suína. Este resultado foi inferior ao observado no estudo de Mürmann *et al.* (2008) que analisaram linguiças frescas suínas comercializadas em Porto Alegre – RS, onde 24,4 % das suas amostras estavam contaminadas com *Salmonella* spp.

Estudos apontam alta prevalência de suínos portadores assintomáticos de *Salmonella* sp., tanto no trato gastrintestinal, como nos linfonodos submandibulares e tonsilas o que pode resultar numa contaminação cruzada durante o processo de fabricação de produtos que utilizam essa matéria prima (Castagna *et al.* 2004). Conforme Forsythe (2002), carnes podem ser contaminadas durante o abate animal, a evisceração, a manipulação no processo e a estocagem inapropriada.

Todas as amostras de produtos lácteos estavam em conformidade para este parâmetro.

A análise microbiológica de clostrídios sulfito redutores a 46 °C foi realizada apenas nos produtos cárneos. Das 1.956 amostras testadas, 1.954 (99,92 %) estavam próprias para consumo, sendo que duas (0,08 %) amostras apresentaram a presença do microrganismo de acordo com figura 4, porem com contagem inferior ao limite estabelecido pela legislação

vigente. Devido à alta prevalência de *Clostridium perfringens* no trato gastrointestinal dos animais dificilmente se consegue evitar a contaminação em carne crua (Hobbs 1979).

Os resultados diferem do encontrado por Duarte (2011) onde 6,1 % dos produtos cárneos registrados junto ao CISPOA, estavam contaminados para este parâmetro. As infecções por *C. perfringens* estão geralmente associadas à carne bovina e frango mal cozidas e de rápida refrigeração, permitindo assim a germinação dos esporos que sobreviveram ao cozimento, podendo crescer a uma temperatura de 45 °C. Os sintomas da intoxicação são diarreia, dores abdominais e náuseas (Pinto 1996).

Em relação à presença de *S. aureus* nas amostras de produtos de origem animal analisadas, todas (100 %) estavam em conformidade com a legislação vigente. Os resultados deste trabalho foram distintos dos resultados observados por Duarte (2011) que observou estafilococos coagulase positiva em 41,2 % dos produtos cárneos e 29,6 % em produtos lácteos registrados junto ao CISPOA no período de janeiro de 2009 a outubro de 2011. Durante o abate, a carne pode ser contaminada por diversas maneiras, como contato com o pêlo, pele, cascos e conteúdo do trato intestinal do animal como também contato com equipamentos e utensílios utilizados no abate e mãos do pessoal envolvido no processo (Leitão 1984). Já para produtos lácteos, a mastite bovina é considerada um dos principais problemas de ordem infecciosa para os bovinos podendo ser de potencial risco na transmissão dos microrganismos patógenos ao homem (Balaban 2000).

Segundo Rodrigues (2004), a enterotoxina de *S. aureus* foi responsável por provocar a intoxicação alimentar em 56 pessoas, de um total de 88, após estas consumirem um sanduiche de galinha, em um restaurante institucional de Pelotas. Provocando nelas sintomas como diarreia, dores abdominais e vômitos.

Em relação aos resultados das bactérias heterotróficas em amostras de água, das 593 amostras de água analisadas, 437 (73,6 %) estavam satisfatórias para consumo, assim como as 119 (20,0 %) que expressaram contagens menores ao estabelecido para bactérias heterotróficas (500 UFC/mL). Entretanto 38 (6,4 %) amostras estavam com contagem de bactérias heterotróficas acima do limite estabelecido, gerando dúvida quanto à segurança e qualidade dessas águas para consumo conforme figura 5. Essas bactérias indicam falha no tratamento da água, contaminação pós-tratamento ou presença de depósitos, biofilmes ou ainda corrosão da tubulação (OMS 2004).

Um aumento considerável dessas bactérias pode comprometer a detecção de microrganismos do grupo coliformes. Embora a maioria dessas bactérias não seja patogênica, pode representar riscos à saúde, como também deteriorar a qualidade da água, provocando odores e sabores desagradáveis (FUNASA 2006).

Doze (2,0 %) amostras de água apresentaram contagem de coliformes totais e duas (0,3%) amostras apresentaram resultado positivo para *E. coli* sendo assim consideradas impróprias para consumo. Quando for verificada presença de coliformes totais na água é recomendado ações corretivas e preventivas e realizar novo ensaio (Portaria nº 5/2017). A ocorrência de *E. coli* é um indicador de contaminação fecal, pois é comumente encontrada no intestino de mamíferos, e se consumida existe um risco a saúde, tendo em vista que algumas cepas podem causar diarreias moderadas a severas e colites hemorrágicas graves (Ziese *et al.* 1996).

Este resultado ficou inferior ao observado por Conte *et al.* (2004) nas águas tratadas e não tratadas da região Nordeste do RS, onde 24,7 % das águas tratadas e 61,7 % nas águas não tratadas apresentaram contaminação por *E. coli*.

CONCLUSÃO

O seguinte trabalho apontou a presença de alguns alimentos em condições sanitárias insatisfatórias para consumo, sendo a contaminação por coliformes termotolerantes com maior predominância. Dentre os produtos com maior frequência para este parâmetro observaram-se as linguiças de carne suína, carnes de frango, queijos e natas.

As contagens de microrganismos abaixo dos valores definidos pela legislação vigente demonstram uma necessária intensificação da higiene e sanitização que envolvem o processo de fabricação do produto a ser consumido.

Portanto a fiscalização deve continuar a ocorrer de forma efetiva garantindo que todo o produto disponibilizado para consumo, apresente padrões microbiológicos satisfatórios evitando assim possível dano a saúde dos possíveis consumidores.

Em relação às águas devem-se manter as medidas preventivas e rigorosas para garantir a qualidade da água utilizada.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o apoio durante a graduação, em especial ao Diogo pela compreensão nas mudanças de humor.

À minha orientadora, Ana Paula Frazzon por ter aceitado me orientar, pela paciência e por todos os ensinamentos ao longo deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia da CIENTEC pelo aprendizado nos quase dois anos de estágio, principalmente a minha co-orientadora Fernanda Godinho pelos

ensinamentos e pela paciência na realização deste trabalho e em especial aos amigos Everton Silveira e Vanise de Medeiros pela contribuição na construção deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora Jeverson Frazzon e Michele Mann por aceitarem o convite e pela avaliação deste trabalho.

E aos amigos que o curso me deu, Aline, Fê, Ju, Lyssa, Marina, Tamara e todos aqueles que estiveram comigo nos momentos de alegrias e frustrações ao longo da graduação.

REFERÊNCIAS

ADAMI, F. S., BOSCO, S. M. D., ALTENHOFEN, G., SOUZA, C. F. V. & OLIVEIRA, E. C. 2015. Avaliação da qualidade microbiológica de linguças e queijos. *Caderno pedagógico*, 12(1): 46-55. <file:///D:/_Downloads/931-936-1-PB.pdf>.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC.

ARAÚJO, T. M., BARAÚNA, A. C. & MENESES, C. A. R. 2009. Identificação de *Escherichia coli* em água de bebedouros e nos próprios aparelhos de quatro escolas públicas de Boa vista – Roraima, Brasil. CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA (CONNEPI), 4., 2009, Belém.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 1990. Official methods of analysis. 15.ed. Washington, D.C.

BRASIL, 2017. Ministério da Saúde. Portaria 5, de 03 de outubro de 2017. Dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Ministério da Saúde.

BRASIL, 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Diário Oficial da União.

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC n 12, de 02/01/2001 Diário Oficial da União. Seção I.

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos estabelecimentos Produtores/Industrializadores de alimentos e a lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação em estabelecimentos produtores/Industrializadores de alimentos. Resolução RDC n° 275, de 21/12/2002 Diário Oficial da União.

BRASIL, 2001. A Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento técnico de Condições higiênicos-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Portaria SVS/MS n°326/97.

BALABAN, N. & RASOOLY, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins (review). *International Journal of Food Microbiology*, 61(1): 1-10.

BARBOSA, D. B., LAGE, M. M. & BADARÓ, A. C. L. 2009. Qualidade microbiológica da água dos bebedouros de um Campus universitário de Ipatinga, Minas Gerais. *NUTRIR GERAIS – Revista Digital de Nutrição*, 3(5): 505-517.

BASTOS, M. do S. R., NASSU, R. T., BORGES, M. de F. & SILVA, J.B. 2001 Inspeção em uma indústria produtora de queijo tipo coalho no estado do Ceará, visando à implantação das boas práticas de fabricação. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 57(1): 130-136.

CASTAGNA, S. M. F., SCHWARZ, P., CANAL, C. W. & CARDOSO, M. R. de I. 2004 Prevalência de suínos portadores de *Salmonella sp.* ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32(2): 141-147.

CONTE, V. D. 2004. Qualidade microbiológica de águas tratadas e não tratadas na região Nordeste do Rio Grande do Sul. *Revista Infarma*, 16(11-12): 83-84.

CZECHOWSKI, L.P; DELLAGOSTIN, D. M., VISENTINI, R. M., OLIVEIRA, F., FACCIN, A., RITTER, F., ARRUDA, T. Z., GUIMARAES, T. G., OLIVEIRA, D. S. & SEBEM, J. G. 2016. Análise microbiológica de creme de leite – nata na região Norte do Rio Grande do Sul. Mostra de iniciação científica Faculdade IDEAU. Getúlio Vargas – RS – Brasil. Disponível em: <https://www.ideau.com.br/getulio/mic/restrito/upload/projeto/arquivo_113.doc> Acesso em: 03 de junho de 2018.

DIAS, P. A., DA CONCEIÇÃO, R. C. S., COELHO, F. J. O., TEJADA, T. S., SEGATTO, M. & TIMM, C. D. 2008. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas – UFPel. Pelotas. *Arquiteto Instituto Biologia*, 75(3): 359-363.

DUARTE, R. S. 2011 Microrganismos mais frequentes encontrados com limite acima dos aceitáveis segundo RDC nº12/2001 da ANVISA em produtos de origem animal, registrados junto a CISPOA. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre, Brasil.

DVE, CEVS, SES; Dados da vigilância epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (VE – DTHA/RS). Disponível em: <<http://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201701/09145217-vigilancia-epidemiologica-das-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar.pdf>>

FERREIRA, G. B., DE OLIVEIRA, A. C. S., MARSON, J. M. & TERRA, A. P. S. 2010. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo “Minas frescal” comercializados na região do triângulo mineiro. *Revista Baiana de Saúde Pública*, 34(3): 575-589.

FERREIRA, W. F. C, SOUSA J. C. F. & LIMA, N. 2010. Microbiologia - Lidel - 4ª Edições Técnicas, Lisboa.

FORSYTHE, S. J. 2002. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Artmed.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (FUNASA) 2013. Ministério da Saúde. Manual prático de análise de água. 4ª Edição, Brasília.

HOBBS, B. C. 1979. *Clostridium perfringens gastroenteritis*. In: Foodborne infection and intoxications. New York: Academic Press.

JAY, J. M. 2005. Microbiologia de Alimentos. 6 ed., Porto Alegre: Artmed.

LEITÃO, M. F. F, 1984. Controle do desenvolvimento microbiano no processo industrial da carne e produtos cárneos. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 21.

MAMMARELLA, R. 2010. O estado do Rio Grande do Sul e sua região metropolitana no Censo 2010. Disponível em: <http://www.observatoriodasmetropoles.net/download/DEMOGRAFIA_RGS_E_RMPA%202000_2010.pdf> Acesso em: 02 de junho de 2018.

MENDES, B. 2010. Microbiologia da água. In: FERREIRA, W.F. C, SOUSA, J.C.F. & LIMA, N. Microbiologia. Ed. Lidel-Lisboa.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SVS, 2016. Surtos de Doenças Transmitidas por alimentos no Brasil. Disponível em <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>

MOREIRA, F. C. 2001. Qualidade microbiológica na linha de processamento de linguiça mista. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu. *Resumos...* Armazém das Letras, p. 369, 2001.

MÜRMAN, L. 2008. *Avaliação de risco de infecção por Salmonella sp. em consumidores de linguiça frescal de carne suína em Porto Alegre, RS*. 128 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

NOVAIS, R. 2010. Microbiologia dos Alimentos. In: FERREIRA, W.F. C, SOUSA, J.C.F. & LIMA, N (Coords). Microbiologia. Ed. *Lidel*- Lisboa.

OLIVEIRA, A. V. B., SILVA, R. A., ARAUJO, A. dos S., BRANDÃO, P. A. & SILVA, F. B. 2011. Padrões microbiológicos da carne de frango de corte – referencial teórico. Mossoró, RN, Brasil. *Revista Verde*, 6(3): 01-16.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE (OMS) 2004. Água encanada segura. Gerenciando a Qualidade da Água Microbiana em Sistemas de Distribuição de Tubulações. Organização Mundial da Saúde. Genebra.

PINTO, A. 1996. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. *Millenium*, 4: 91-100.

RODRIGUES, K. L., MOREIRA, A. N., ALMEIDA, A. T. S., CHIOCHETTA, D., RODRIGUES, M. J., BROD, C. S., CARVALHAL, J. B. & ALEIXO, J. A. G. 2004. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. Santa Maria. *Ciência Rural*, 34(1): 297-299.

SCHEID F. V. B., ROOS, T. B., OLIVEIRA, D. S. & TIMM, C. D. 2004. Avaliação higiênico-sanitária da produção de queijo colonial no município de Três Passos, RS. In: 16° CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Passo Fundo, Brasil.

SILVA, N. Da. 1997. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Valéria Christina Amstalden - São Paulo: Livraria Varela, p31.

STAMFORD, T. L. M., DA SILVA, C. G. M., MOTA, R. A. & CUNHA NETO, A. 2006. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1): 41-45.

SOUSA, C. P. 2006. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. *Revista APS*, 9(1): 83-88.

SOUZA, D. A. 2000. *Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de multiresíduos de pesticidas em águas de abastecimento de São Carlos – SP*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

VAN AMSON, G., HARACEMIV, S. M. & MASSON, M. L. 2000. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, No período de 1978 a 2000. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(6): 1139-1145.

ZIESE, T., ANDERSON, Y., JONG, B., LOFDHAL, S. & RAMBERG M., 1996 Surto de *Escherichia coli* O157 na Suécia. *Relatórios de investigação de surtos*, 1(1): 16.

WELKER, C. A. 2009. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 8(1): 44-48.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

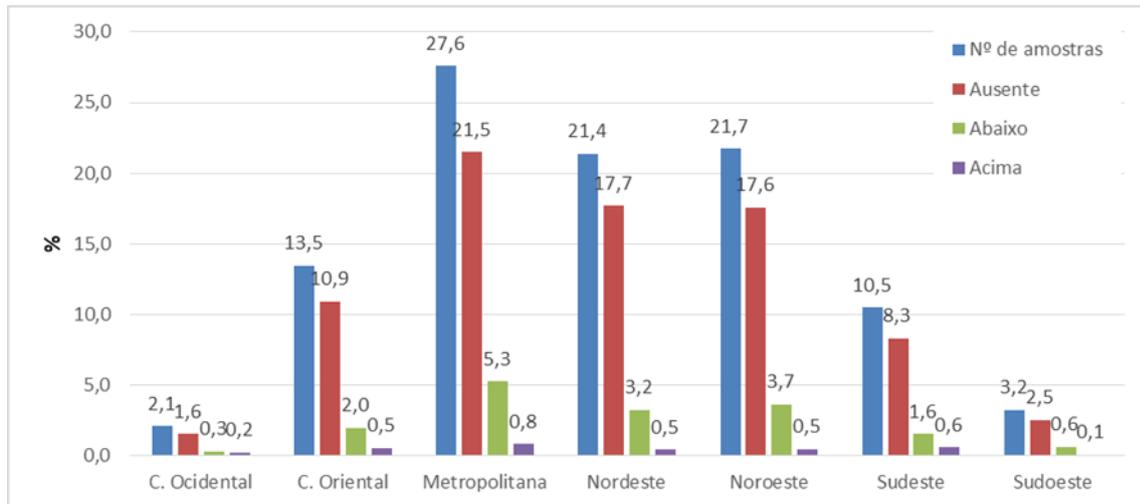


Figura 1. Percentual e grau de contaminação de amostras por Mesoregião.

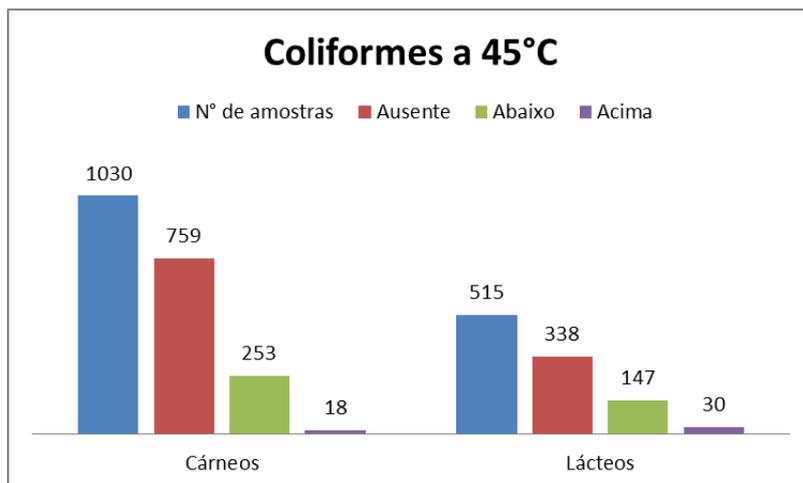


Figura 2. Amostras e número de amostras apresentando ou não contaminação para coliformes a 45° C.

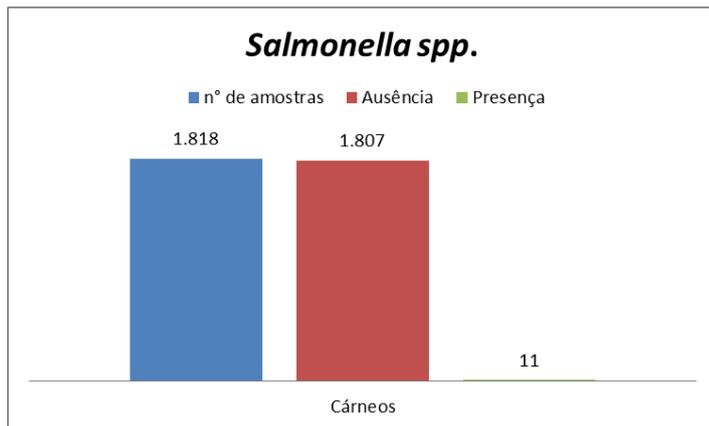


Figura 3. Percentual das análises de *Salmonella* spp. em produtos cárneos.

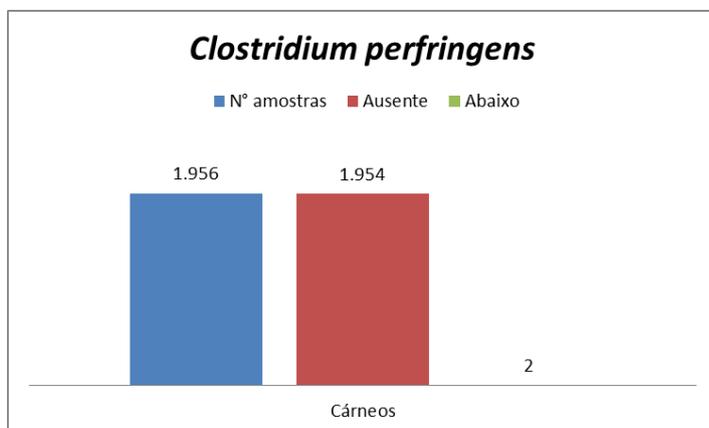


Figura 4. Percentual das análises para *Clostridium perfringens* em produtos cárneos.

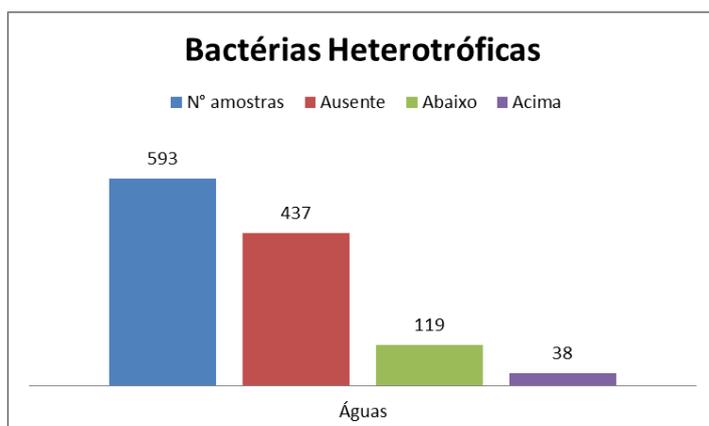


Figura 5. Percentual das análises para bactérias heterotróficas em águas.

Revista Brasileira de Biociências

Instruções para autores

PREPARANDO OS ARQUIVOS

Os textos deverão ser formatados em uma coluna, usando a fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo e todas as margens com uma polegada (2,54 cm), em formato de papel A4. Todas as páginas devem ser numeradas sequencialmente. Não numere as linhas. O manuscrito deverá estar em formato Microsoft® Word DOC (versão 2 ou superior). Arquivos em formato RTF também serão aceitos. Não submeta arquivos em formato Adobe® PDF. O arquivo que contém o texto principal do manuscrito não deverá incluir qualquer tipo de figura ou tabela. Estas deverão ser submetidas como documentos suplementares, separadamente. Ao submeter um manuscrito, o autor responsável pela submissão deverá optar por uma das seguintes seções: ‘Artigo completo’, ‘Revisão’ ou ‘Nota científica’. Todos os manuscritos submetidos no envio on-line deverão subdivididos em DOCUMENTO PRINCIPAL e DOCUMENTO(S) SUPLEMENTAR(ES).

DOCUMENTO PRINCIPAL

Primeira página. Deverá conter as seguintes informações:

- a) Título do trabalho, conciso e informativo, com a primeira letra em maiúsculo, sem abreviações;
- b) Nome completo e por extenso do(s) autor(es), com iniciais em maiúsculo;
- c) Título resumido do trabalho, com até 75 caracteres (incluindo espaços);
- d) afiliações e endereço completo de todos os autores (instituição financiadora (auxílio ou bolsas), deverá constar nos Agradecimentos);
- e) Identificação do autor para contato e respectivo e-mail (apenas o autor para contato deverá fornecer um e-mail).

Segunda página. Deverá conter as seguintes informações:

- a) Resumo: incluir o título do trabalho em português (entre parênteses), quando o trabalho for escrito em inglês;
- b) Abstract: incluir o título do trabalho em inglês (entre parênteses). Tanto Resumo como o Abstract deverão conter, no máximo, 250 (duzentos e cinquenta) palavras, estruturados em apresentação, contendo o contexto e proposta do estudo, resultados e conclusões (por favor, omita os títulos);
- c) Palavras-chave e key words para indexação: no máximo cinco, não devendo incluir palavras do título.

Páginas subsequentes. ‘Artigos completos’ e ‘Notas científicas’ deverão estar estruturados em Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (Resultados e Discussão podendo ser reunidos), Agradecimentos e Referências, seguidos de uma lista completa das legendas das figuras e tabelas (submetidos como documentos suplementares).

Os nomes científicos, incluindo os gêneros e categorias infragenéricas, deverão estar em *itálico*. As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, deverão ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco

(UFPE). Escrever os números até dez por extenso, a menos que sejam seguidos de unidade de medida, ou indiquem numeração de figuras e tabelas. Utilize um espaço para separar as unidades de medidas dos valores (10 m, por exemplo; não use 10m). A unidade de temperatura em graus Celsius deve ser escrita com um espaçamento entre o valor numérico (23 oC, por exemplo; não use 23oC). A posição preferencial de cada figura ou tabela não deverá ser indicada no texto. Isso ficará a critério do editor, durante a editoração. Sempre verifique que as figuras e tabelas estejam citadas no texto. No texto, use abreviaturas (Fig. 1 e Tab. 1, por exemplo). Evitar notas de rodapé. Se necessárias, utilizar numeração arábica em sequência.

As citações de autores no texto, deverá seguir os seguintes exemplos: Baptista (1977), Souza & Barcelos (1990), Porto *et al.* (1979) e (Smith 1990, Santos *et al.* 1995). Citar o(s) autor(es) das espécies só a primeira vez em que as mesmas forem referidas no texto. Citações de resumos de simpósios, encontros ou congressos deverão ser evitadas. Use-as somente se for absolutamente necessário. Comunicações pessoais não deverão ser incluídas na lista de Referências, mas poderão ser citadas no texto. A obtenção da permissão para citar comunicações pessoais e dados não publicados é de exclusiva responsabilidade dos autores. Abreviatura de periódicos científicos deverá seguir o Index Medicus/MEDLINE. Citações, nas Referências, deverão conter todos os nomes dos autores (não use *et al.*)

As referências deverão seguir rigorosamente (sob pena de arquivamento da submissão) os seguintes exemplos (respeitar espaçamentos e uso do itálico, por favor):

Artigos publicados em periódicos:

BONGERS, F., POPMA, J., MEAVE, J. & CARABIAS, J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, 74: 55-80.

QUADRA, A. A. & AMÂNCIO, A. A. 1978. A formação de recursos humanos para a saúde. *Ciência e Cultura*, 30(12): 1422-1426.

ZANIN, A., MUJICA-SALLES, J. & LONGHI-WAGNER, H. M. 1992. Gramineae: Tribo Stipeae. *Boletim do Instituto de Biociências*, 51: 1-174. (Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, 22).

Livros publicado por editoras:

CLEMENT, S. & SHELFORD, V. E. 1960. *Bio-ecology: an introduction*. 2nd ed. New York: J. Willey. 425 p.

LOWE-MCCONNEL, R.H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge: Cambridge University Press. 382 p.

Capítulos de livro:

CEULEMANS, R. & SAUGIER, B. 1993. Photosynthesis. In: RAGHAVENDRA, A. S. (Ed.). *Physiology of Trees*. New York: John Wiley & Sons. p. 21-50.

NAKATANI, K., BAUMGARTNER, G. & CAVICCHIOLI, M. 1997. Ecologia de ovos e larvas de peixes. In: VAZZOLER, A. E. A. M., AGOSTINHO A. A. & HAHN, N. S. (Eds.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM. p. 281-306.

Anais de encontros, congressos, etc.:

CARNEIRO, F. G. 1997. Numerais em esfero-cristais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 49., 1997, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Ed. da UFMG. 1 CD-ROM.

SANTOS, R. P. & MARIATH, J. E. A. 2000. Embriologia de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: estudo da antera e grão de pólen e sua aplicação no melhoramento. In: WINGE, H. (Org.). CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2., 2000, Encantado, RS e REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., 2000, Encantado, RS. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO. p. 140-142.

Dissertações de mestrado, doutorado:

DILLENBURG, L. R. 1986. *Estudo fitossociológico do estrato arbóreo da mata arenosa de restinga em Emboaba, RS*. 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

Links de páginas disponíveis na Internet:

POLÍTICA. 1998. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática. Disponível em: <http://www.priberam.pt/Dicionarios/dlp.htm>. Acesso em: 8 mar. 1999.

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. 2012. Disponível em: <http://www.ipni.org>. Acesso em: 26 ago. 2012. Para documentos com DOI® (Digital Object Identifier) conhecido, seguir o exemplo abaixo (não usar “Disponível em:<...>Acesso em:....”):

SANTOS, R.P., MARIATH, J.E.A. & HESSE, M. 2003. Pollenkit formation in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). *Plant Syst. Evol.*, 237: 185-198. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-002-0257-2>

Em trabalhos de taxonomia vegetal e florística, as seguintes normas específicas deverão ser observadas:

1. *Chaves de identificação*: dicotômicas, indentadas, utilizando alternativas 1-1'. Os táxons devem ser numerados em ordem alfabética, dentro de sua categoria taxonômica e na ordem em que aparecerão no texto.
2. As *descrições* devem ser sucintas e uniformes.
3. *Autores de nomes científicos* devem ser citados de forma abreviada, de acordo com Brummit & Powell (1992).
4. *Citações e abreviaturas* das Opus Princeps devem seguir Stafleu et al. (1976-1988). No caso de periódicos, seguir Bridson & Smith (1991). Como alternativa, seguir o *International*

Plant Names Index (IPNI - <http://www.ipni.org/index.html>), onde as citações seguem as obras mencionadas acima.

5. *Índice de nomes científicos* citados no manuscrito: no caso de monografias, o índice deve relacionar, em ordem alfabética, os táxons abaixo do nível de gênero, sem os autores, colocando em negrito a página onde inicia a descrição do táxon. Os nomes válidos devem ser citados em letra normal e os sinônimos em itálico.

6. Incluir a lista de exsicatas apresentadas no manuscrito:

Schultz, A. : 12 (2.8-ICN), 25 (2.9-BLA, ICN)

12 e 25=números do coletor.

2.8=2 número do gênero e 8 número da espécie, no trabalho.

ICN=sigla do herbário onde está depositado o espécime citado.

Caso o trabalho trate apenas de um gênero:

Schultz, A. : 110 (3-ICN)

3=número da espécie.

No caso de dois ou mais coletores, citar apenas o primeiro.

Se o coletor não tiver número de coleta:

Barreto, I. L. : BLA 1325 (número do gênero e espécie, ou só o número da espécie).

7. *Material examinado*: deverá ser citado apenas material selecionado, um exemplar por município. Se a relação de material selecionado for muito extensa (ou se o autor não julgar necessário), citar todos os municípios. De modo a demonstrar a distribuição geográfica do táxon e não ultrapassar o número de páginas previstas, deverão ser citados apenas um ou poucos exemplares por região fisiográfica (Fortes 1959). Quando forem dois coletores usar o &. Mais de dois coletores, citar o primeiro e usar o et al. Países, estados, municípios e localidades devem ser citados em ordem alfabética.

Exemplos: BRASIL. RIO GRANDE DO SUL: Torres, 23 maio 1975, *L.R. Dillenburg 17* (ICN);

Tupanciretã, 8 jul. 1977, *L.R.M. Baptista et al.* 911 (ICN); Uruguaiana, 25 mar. 1978; *M.L. Porto s.n.* (ICN 2530);

Vacaria, 1 abr. 1975, *B. Irgang & P. Oliveira 45* (BLA, ICN).

Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul:

1. *Lupinus albescens* Hook. & Arn., *Bot. Misc.* 3: 201. 1833 (Fig. 1).

Sinonímia (citar o basônimo, quando for o caso. Citar outros sinônimos somente quando for estritamente necessário para o conhecimento do táxon na área estudada).

Descrição: baseada em material do Rio Grande do Sul, em dois parágrafos, vegetativo e reprodutivo.

Distribuição geográfica: geral e no Rio Grande do Sul, esta última utilizando as regiões fisiográficas de Fortes (1959). Não devem ser utilizados mapas com pontos de coleta no Rio Grande do Sul.

Habitat:

Observações:

Material selecionado: citar somente material do Rio Grande do Sul. Se necessário, por deficiência deste material, citar “material adicional examinado” de outras regiões.

DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

Figuras. Todas as imagens (ilustrações, fotografias, fotomicrografias, eletromicrografias e gráficos) são consideradas ‘figuras’. Figuras e tabelas devem ser fornecidos como arquivos separados (documentos suplementares), nunca incluídos no texto do documento principal.

Figuras coloridas serão permitidas e os editores estimulam que os autores assim o façam. Não haverá cobrança de custos adicionais para figuras a cores, já que a impressão das mesmas (quando houver) será sempre feita em preto e branco. A Revista Brasileira de Biociências não aceitará figuras submetidas no formato GIF ou comprimidas em arquivos do tipo RAR ou ZIP. Se as figuras no formato TIFF são um obstáculo para os autores, por seu tamanho muito elevado, os autores podem convertê-las para o formato JPEG, antes da sua submissão, resultando em uma significativa redução no tamanho. Entretanto, não se esqueça que a compressão no formato JPEG pode causar prejuízos na qualidade das imagens. Assim, é recomendado que os arquivos JPEG sejam salvos nas qualidades ‘Alta’ (High) ou ‘Máxima’ (Maximum). Não forneça imagens em arquivos Microsoft® PowerPoint (geralmente geradas com baixa resolução), nem embebidas em arquivos do Microsoft Word (DOC). Arquivos contendo imagens em formato Adobe® PDF também não serão aceitos. A submissão será arquivada se conter figuras em arquivos DOC, PDF ou PPT. Cada figura deverá ser editada para minimizar as áreas de espaços em branco, otimizando o tamanho final da ilustração. Se a figura consiste de diversas partes separadas, é importante que uma simples figura seja submetida, contendo todas as partes da figura. Escalas das figuras deverão ser fornecidas com os valores apropriados e devem fazer parte da própria figura (inseridas com o uso de um editor de imagens, como o Adobe® Photoshop, por exemplo), sendo posicionadas no canto inferior esquerdo de cada figura. Ilustrações em preto e branco deverão ser fornecidas com aproximadamente 300 dpi de resolução, em formato TIFF ou JPG. Para fotografias (em preto e branco ou coloridas), fotomicrografias ou eletromicrografias, forneça imagens em TIFF ou JPG, com pelo menos, 300 dpi.

ATENÇÃO! Como na editoração final dos manuscritos o tamanho útil destinado a uma figura de largura de página (duas colunas) é de 170 mm, para uma resolução de 300 dpi, a largura mínima das figuras deve ser 2000 pixels. Para figuras de uma coluna (82 mm de largura), a largura mínima das figuras (para 300 dpi), deve ser pelo menos 1000 pixels.

Submissões de figuras fora destas características acima (larguras mínimas em pixels) serão imediatamente arquivadas. As imagens que não contêm cor devem ser salvas como ‘grayscale’, sem qualquer tipo de camada (‘layer’), como as geradas no Adobe® Photoshop, por exemplo (estes arquivos ocupam até 10 vezes mais espaço que os arquivos TIFF e JPG). Os tipos de fontes nos textos das figuras deverão ser Arial ou Helvetica. Textos deverão ser legíveis. Abreviaturas nas figuras (sempre em minúsculas) devem ser citadas nas legendas e fazer parte da própria figura, inseridas com o uso de um editor de imagens (Adobe® Photoshop, por exemplo). Não use abreviaturas, escalas ou sinais (setas, asteriscos), sobre as figuras, como “caixas de texto” do Microsoft® Word. Recomenda-se a criação de uma única estampa, contendo várias figuras reunidas, numa largura máxima de 170 milímetros (duas colunas) e altura máxima de 257 mm (página inteira). A letra indicadora de cada figura deve estar posicionada no canto inferior direito. Inclua “A” e “B” (sempre em maiúsculas, não “a”, “b”) para distingui-las colocando, na legenda, Fig. 1A, Fig. 1B, e assim por diante. Não envie figuras com legendas inseridas na base das mesmas. As legendas das figuras deverão ser enviadas no final do documento principal, imediatamente após as Referências. Não use bordas de qualquer tipo ao redor das figuras. Se houver composição de figuras (Figs 1A, 1B, etc.), use cerca de 1 mm (12 pixels para uma figura com largura de 2000 pixels) de espaço em branco entre cada figura. É responsabilidade dos autores obter a permissão para reproduzir figuras ou tabelas que tenham sido previamente publicadas.

Para cada figura, deverão ser fornecidas as seguintes informações: número da figura (em ordem numérica, usando algarismos arábicos (Figura 1, por exemplo; não abrevie) e a legenda detalhada, com até 300 caracteres (incluindo espaços).

Tabelas. Cada tabela deverá ser numerada sequencialmente, com números arábicos (Tabela 1, 2, 3, etc; não abrevie). O título das tabelas deverá estar acima das mesmas. Tabelas deverão ser formatadas usando as ferramentas de criação de tabelas ('Tabela') do Microsoft® Word. Colunas e linhas da tabela devem ser visíveis, optando-se por usar linhas pretas que serão removidas no processo de edição final. Não utilize padrões, tons de cinza, nem qualquer tipo de cor nas tabelas. Dados mais extensos podem ser enviados como arquivos suplementares, mas que não estarão disponíveis no próprio artigo, mas como links para consulta pelo público.