

ARTIGO

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.00838>

# Desenvolvimento de itens de ensaio de proficiência para pesquisa de *Salmonella* spp. em matriz chocolate

## Development of proficiency test items for *Salmonella* spp. research in chocolate matrix

Maria Luiza Cabral da Silva

Marcelo Luiz Lima Brandão

Carla de Oliveira Rosas

Valéria de Mello Medeiros

Cátia Cardoso da Silva

Rodrigo Domingos Overa Tavares

Silvia Maria dos Reis Lopes\*

Paola Cardarelli-Leite

### RESUMO

O objetivo desse estudo foi desenvolver itens de ensaio (IE) liofilizados contendo *Salmonella* spp., em matriz chocolate, para utilização em ensaio de proficiência (EP). Foi realizada a análise microbiológica de uma amostra de chocolate granulado para verificar se estava livre do micro-organismo alvo. Para monitoramento da qualidade dos IE, realizou-se estudos de homogeneidade e estabilidade em longo e curto prazo, bem como verificou-se a presença de vácuo nas amostras garantindo a eficiência do processo de liofilização. A análise microbiológica do chocolate indicou ausência de contaminação por *Salmonella* spp., estando apto para ser utilizado como matriz. A técnica de liofilização, com uso de trealose como crioprotetor, se mostrou eficaz para dessecação dos IE produzidos. O lote produzido se apresentou suficientemente homogêneo, pois o micro-organismo estava presente em todos os frascos analisados. O lote se apresentou estável à temperatura de -20°C (em cinco semanas) e -70°C (em 26 semanas); na estabilidade de transporte, foi considerado estável a 4°C (em quatro dias). O lote de IE produzido nesse estudo apresentou qualidade que o torna apto para uso em EP, o que visou contribuir para o aumento da confiabilidade dos resultados das análises dos laboratórios e propiciar subsídios para a identificação e solução de problemas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Item de Ensaio; Ensaio de Proficiência; Chocolate; *Salmonella* spp; Vigilância Sanitária

### ABSTRACT

The aim of this study was to develop lyophilized test items (TI) containing *Salmonella* spp., in chocolate matrix to be used in proficiency testing programs (PTP). Microbial analysis was conducted on samples of granulated chocolate to verify that the sample was free of the target microorganisms. Homogeneity and stability studies in long and short term were carried out to monitor TI quality; the presence of vacuum in the samples was also verified, to ensure the efficiency of the lyophilization process. The results of the microbial testing indicated no contamination by *Salmonella* spp.; thus, the sample was appropriate to be used as matrix. The lyophilization technique, using trehalose as cryoprotectant, has proven to be effective for desiccation of TI produced. The *Salmonella* batch proved to be sufficiently homogeneous, because the microorganism was present in all analyzed flasks. The batch was held stable at -20°C (five weeks) and -70°C (26 weeks). As for the transportation stability, the batch was considered stable at 4°C (in four days). The TI produced batch in this study showed a quality level that makes it suitable to be used in PTP, to contribute to the increasing reliability of the test results from laboratories and to provide subsidies for identification of problems and troubleshooting.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* E-mail: [silvia.lopes@incqs.fiocruz.br](mailto:silvia.lopes@incqs.fiocruz.br)

**KEYWORDS:** Test Item; Proficiency Testing Programs; Chocolate; *Salmonella* spp; Sanitary Surveillance

Recebido: 25 ago 2016  
Aprovado: 02 maio 2017



## INTRODUÇÃO

O chocolate é a forma predominante de consumo do cacau, representando cerca de 90% do mercado de cacau<sup>1</sup>. O chocolate é um alimento consumido por 75% da população do Brasil, que é no mundo o 4° país em consumo e o 3° maior produtor desse alimento. Em 2013 as indústrias de chocolate produziram 800 mil toneladas para o setor<sup>2</sup>. O consumo *per capita* de chocolates no Brasil está na média de 2,8 kg por pessoa ao ano<sup>2</sup>.

A RDC n° 12, de 2 de janeiro de 2001, estabelece os padrões microbiológicos para alimentos<sup>3</sup> e, para a avaliação da qualidade microbiológica de chocolate, a legislação cita a ausência de *Salmonella* spp em 25 gramas.

*Salmonella* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza sendo o trato intestinal do homem e dos animais o principal reservatório. Este micro-organismo é eliminado nas fezes e pode ser transmitido pela via fecal-oral. As infecções por *Salmonella* no homem são caracterizadas por infecções intestinais que podem progredir para infecções sistêmicas. Muitos alimentos têm sido identificados como veículo para a transmissão desse agente patogênico para o ser humano como: ovos, carne de suínos e de aves, leite, chocolate, frutas e legumes<sup>4</sup>.

As toxinfecções alimentares constituem um sério problema de saúde pública. De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), por ano, um em cada seis americanos (ou 48 milhões de pessoas) apresentam doenças transmitidas por alimentos (DTA)<sup>5,6</sup>. No Brasil, no período de 2000 a 2014 ocorreram 9.719 surtos de DTA e a *Salmonella* spp. foi o agente mais prevalente com 1.564 surtos<sup>7</sup>.

Os laboratórios são imprescindíveis para o controle sanitário dos produtos para a saúde. Por meio de análises fiscais e controle da qualidade, eles intervêm na produção científica e tecnológica, na avaliação de conformidade de produtos e na análise e gerenciamento de risco<sup>8</sup>. A qualidade em laboratórios é obtida pela execução de atividades técnicas e administrativas com organização e planejamento desde a amostragem até a liberação dos resultados, visando que estes sejam precisos, exatos, rastreáveis e, conseqüentemente, confiáveis<sup>9</sup>. Para gerenciar a qualidade, a principal norma adotada é a ABNT ISO/IEC 17.025<sup>10</sup>. Um dos itens necessários para a acreditação de ensaios por essa norma é a participação periódica em ensaios de proficiência (EP) e/ou comparações interlaboratoriais. Os EP são estudos interlaboratoriais utilizados como ferramenta de avaliação externa da qualidade e demonstração da confiabilidade dos resultados analíticos para os clientes, órgãos de acreditação e regulamentadores. Servem também para identificar falhas e possibilitar a tomada de ações corretivas ou preventivas<sup>11,12</sup>.

Na área de microbiologia de alimentos, o número de provedores de EP é reduzido e os custos cobrados para a participação nestes ensaios, em geral, são muito elevados. Desse modo, o desenvolvimento de itens de ensaio nacionais para EP na área de microbiologia de alimentos facilita a participação de laboratórios brasileiros nesses ensaios<sup>13</sup>.

Segundo a ABNT ISO/IEC 17.043<sup>11</sup>, um item de ensaio (IE) de proficiência é uma amostra, produto, artefato, material de referência, equipamento, padrão, conjunto de dados ou outra informação utilizada pelo ensaio de proficiência.

Para assegurar no processo analítico um alto nível de confiabilidade dos dados gerados, o IE deve exibir uma composição da matriz similar à amostra e uma concentração apropriada do analito de interesse<sup>10</sup>. Além disso, os IE devem ser suficientemente homogêneos e estáveis<sup>14</sup>.

No caso de IE microbiológicos, um dos mais efetivos métodos de preservação para a maioria dos micro-organismos é a liofilização, que consiste na remoção do vapor de água diretamente de amostras congeladas e secagem sob vácuo, até produção de material estável<sup>15</sup>.

O uso de crioprotetores nessa técnica possibilita um aumento na sobrevivência das bactérias durante um longo período na matriz<sup>16</sup>. Existem várias substâncias que podem ser utilizadas como crioprotetores, como carboidratos, proteínas e polímeros<sup>17</sup>. Os carboidratos, principalmente os dissacarídeos como sacarose e trealose, são os mais utilizados<sup>16</sup>. Essas moléculas de açúcar podem substituir moléculas de água que hidratam proteínas e membranas, prevenindo a desnaturação das proteínas<sup>18</sup>. A trealose tem sido indicada como componente essencial para a manutenção da viabilidade de células de leveduras, fungos, bactérias, insetos e plantas sob condições de estresse<sup>19</sup>. Algumas bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* são capazes de produzir trealose endógena para proteger a célula em resposta a condições adversas de crescimento como estresse osmótico e redução de nutrientes, como a fase estacionária e meios com reduzida concentração de nutrientes<sup>20</sup>.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver IE contendo *Salmonella* spp. em matriz chocolate, utilizando o método de liofilização, para ser utilizado em EP em microbiologia de alimentos.

## MÉTODO

### Análise Microbiológica do Chocolate Granulado

Foi realizada análise microbiológica de pesquisa de *Salmonella* spp., segundo a metodologia recomendada por Andrews et al.<sup>21</sup>.

### Preparo da Suspensão Bacteriana e Produção dos Itens de Ensaio

Foi preparado um lote contendo *Salmonella* com aproximadamente 210 frascos, com 1 g de chocolate granulado.

Para o preparo da suspensão de *Salmonella*, foi utilizada uma cepa de *Salmonella* Enteritidis PT4 depositada na coleção de pesquisa do Laboratório de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ, identificada como P3440, isolada de alimento. Um volume de 100 µL de uma suspensão criopreservada foi transferido para 10 mL do meio de cultura infusão cérebro coração (*Brain Heart Infusion* - BHI) (Merck, Alemanha). Após um período de incubação de 24 horas a



35°C ± 2°C, 500 µL do crescimento obtido foram semeados em 10 mL do meio de cultura Luria Bertani (LB) (BD, França) com 10% de NaCl e incubado a 35°C ± 2°C por 28 horas. Após a incubação, a cultura foi centrifugada e o *pellet* foi ressuspendido em salina peptonada 0,1% (SSP 0,1%) com 100 mM de trealose, a leitura da concentração de células foi realizada em fotocolorímetro (Libra S2, Biochrom, Inglaterra) em comprimento de onda de 520 nm, para atingir aproximadamente 2,0 x 10<sup>9</sup> UFC/mL. Foram realizadas diluições em SSP 0,1% até uma concentração aproximada de 2,0 x 10<sup>6</sup> UFC/mL. Ao atingir essa concentração foi realizada uma diluição 1:100 adicionando três mililitros da suspensão bacteriana em 297 mL de SSP 0,1% com 100 mM de trealose, resultando em uma concentração aproximada de 2,0 x 10<sup>4</sup> UFC/mL. A suspensão final foi homogeneizada em uma placa agitadora sem aquecimento (Corning, EUA), com o uso de um magneto, por 20 minutos. Com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow, Inglaterra), foram distribuídos 0,5 mL da suspensão bacteriana nos 210 frascos de vidro contendo 1 g de chocolate granulada. Em seguida os frascos foram armazenados em ultrafreezer a aproximadamente -70 °C (Thermo, EUA) por 24 horas. Após esse período, foram retirados do freezer e submetidos a um ciclo de liofilização de 24 horas (Liotop, BRASIL).

#### Verificação do Vácuo

Após a retirada dos frascos do liofilizador (Liotop, Brasil), foi realizada a verificação de vácuo de todos os frascos do lote, utilizando o aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil, Brasil), para avaliar a eficiência do processo de liofilização. Os frascos com vácuo foram lacrados, identificados e estocados à temperatura ≤ -70°C.

#### Estudo da Homogeneidade

Para a avaliação da homogeneidade foram selecionados aleatoriamente 21 frascos do lote produzido. A análise de cada frasco foi realizada em duplicata. Após a retirada dos frascos do freezer, estes foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos. Os líofilos foram reconstituídos com 1 mL de SSP 0,1% e mantidos em repouso por 15 minutos. Foi realizada uma diluição 1:10 e em seguida foi transferido um volume de 1 mL para a superfície de duas placas estéreis. Em cada uma das placas foi acrescentado um volume de 10 mL de ágar vermelho neutro cristal violeta bile glicose (VRBG) (Difco, EUA). Após a solidificação, uma nova camada de ágar VRBG foi adicionada, com a finalidade de se obter um ambiente de anaerobiose, propício para o crescimento da *Salmonella*. As placas foram incubadas a 35°C ± 2°C por 24 horas. Após a incubação foi realizada a contagem das colônias nas placas semeadas. Uma vez que se trata de um ensaio qualitativo, o critério utilizado para a avaliação da homogeneidade foi a presença ou a ausência de *Salmonella* spp. no IE avaliado. Os itens foram considerados homogêneos quando todos os resultados apresentaram presença de *Salmonella* spp., ou seja, as placas que apresentaram crescimento de colônias foram consideradas positivas.

#### Estudo da Estabilidade

Foram realizados estudos de estabilidade em curta e em longa duração. O estudo em curta duração foi realizado nas

temperaturas 4°C ± 4°C e 35°C ± 2°C, com objetivo de simular o transporte aos laboratórios participantes de um EP.

O estudo em curta duração foi realizado durante o período de quatro dias e foi avaliado seguindo os critérios da ABNT ISO GUIA 35<sup>22</sup>. Foram selecionados aleatoriamente 18 frascos do lote produzido estocado a ≤ -70°C (temperatura de referência). A cada dia, quatro frascos foram retirados do freezer e acondicionados em duas embalagens próprias para transporte de material biológico (Concepta, Brasil), dois frascos por embalagem. Durante os quatro dias do estudo, as caixas foram mantidas em temperaturas diferentes, uma das caixas a 4°C ± 4°C e a outra a 35°C ± 2°C. No quarto dia (dia zero), todos os 18 frascos foram analisados ao mesmo tempo, sob as mesmas condições de análise (a contagem do dia zero foi utilizada para as duas temperaturas do estudo, pois os frascos não foram incubados). Já o estudo em longa duração foi realizado nas temperaturas de referência (≤ -70°C) e de armazenamento (-20°C ± 4°C) e avaliados segundo os critérios da ABNT ISO GUIA 35<sup>22</sup>. A cada dia de análise, dois frascos do lote produzido, estocados a ≤ -70°C, foram selecionados aleatoriamente e analisados de acordo com a metodologia descrita no teste da homogeneidade, num período total de 26 semanas (nos tempos: zero, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 22 e 26 semanas) totalizando 18 frascos. A análise na temperatura de -20°C ± 4°C foi realizada para simular a estocagem do IE nos laboratórios. Para isso, num período de cinco semanas, foram selecionados aleatoriamente, a cada sete dias, dois frascos estocados a -20°C ± 4°C, e analisados de acordo com a metodologia descrita no teste da homogeneidade, totalizando 12 frascos.

A avaliação estatística foi realizada segundo a ABNT ISO GUIA 35<sup>22</sup>, a partir da análise da regressão linear do valor de concentração do analito. Os resultados de contagem em UFC/g de cada frasco foram convertidos em log<sub>10</sub>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O chocolate é um tipo de alimento consumido por pessoas de todas as idades, pois, além das apreciadas propriedades sensoriais, ele apresenta benefícios potenciais à saúde humana<sup>2</sup>. Surto de salmonelose foram relacionados ao consumo de chocolate, fazendo com que o controle microbiológico desse produto seja de grande importância<sup>23</sup>. A análise microbiológica de chocolate granulada, para pesquisa de *Salmonella* spp., indicou que a amostra não continha o micro-organismo alvo do estudo, sendo considerada satisfatória para utilização como matriz para a produção de IE.

Brant et al.<sup>24</sup> explicaram que a ausência de *Salmonella* spp. em amostras de chocolate pode estar relacionada à menor capacidade de competição dessa bactéria em relação a outros micro-organismos de maior ocorrência, como os coliformes. Devido à importância do controle microbiológico, os laboratórios que realizam estas análises devem garantir resultados precisos e confiáveis, pois um resultado falso-positivo pode originar um desnecessário desperdício de um gênero alimentício e impactos financeiros, já um resultado falso-negativo pode originar sérios problemas de saúde pública<sup>25</sup>.



Nesse estudo foi utilizado o método de liofilização para preservação da bactéria. Esse método se destaca para a maioria dos micro-organismos por garantir a identidade original da célula por longos períodos<sup>26</sup>. A inspeção de vácuo realizada no presente trabalho exibiu vácuo em 100% dos frascos do lote produzido. Outros trabalhos que utilizaram o método de liofilização também mostraram seus resultados da inspeção de vácuo, como Costa et al.<sup>13</sup>, Brandão et al.<sup>14</sup> e Brandão et al.<sup>16</sup> em 96,5% dos frascos produzidos em matriz queijo, em 98,2% em matriz queijo e em 94,2% em matriz carne bovina, respectivamente.

O lote de *Salmonella* spp. foi considerado suficientemente homogêneo, pois o micro-organismo estava presente em todos os frascos analisados (Tabela 1).

Outros estudos desenvolveram IE para Microbiologia de Alimentos pelo método de liofilização e também produziram lotes homogêneos, como Costa et al., que desenvolveram lotes para pesquisa de *Salmonella* spp. em matriz queijo<sup>13</sup>. Brandão et al.<sup>16</sup> produziram lotes homogêneos para *Salmonella* spp. em matriz carne bovina crua e lotes não homogêneos em matriz carne cozida e enlatada por liofilização. Em matriz leite, Rosas et al.<sup>27</sup> obtiveram lotes homogêneos para *Salmonella* spp. por liofilização e Schulten et al.<sup>28</sup>, lote homogêneo para *Salmonella* Typhimurium em cápsulas de leite em pó por *spray-dryer*.

Tabela 1. Resultado das contagens em Log<sub>10</sub> do teste da homogeneidade do lote produzido.

Item de Ensaio (Frasco)	Log <sub>10</sub> * x (unidades formadoras de colônias/grama)	
	Contagem 1	Contagem 2
2	3,17	3,03
14	3,26	3,12
21	3,21	3,12
31	3,07	2,96
43	3,03	2,96
50	3,08	2,9
60	3,13	2,72
72	3,14	2,94
79	3,11	2,98
89	2,91	2,91
101	3	2,83
108	3,2	3,14
118	3,03	3,02
130	2,86	2,72
137	2,82	2,78
147	2,87	2,84
159	2,73	2,72
166	2,87	2,81
176	2,98	2,88
188	2,76	2,75
195	2,79	2,72
Resultado: suficientemente homogêneo		

\*log<sub>10</sub> - logaritmo de base 10

### Avaliação da Estabilidade

Os resultados referentes ao estudo da estabilidade em curto prazo nas temperaturas de 4 °C ± 4°C e 35 °C ± 2°C estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 1. O estudo de estabilidade em longo prazo nas temperaturas de referência (≤ -70°C) e de armazenamento (-20°C ± 4°C) estão representados na Tabela 3 e nas Figuras 2 e 3.

Tabela 2. Resultado da média das contagens em Log<sub>10</sub> do estudo de estabilidade em curto prazo durante quatro dias nas temperaturas de 4 °C e 35 °C.

Dias	Log <sub>10</sub> * x (unidades formadoras de colônias/grama)	
	4°C ± 4°C	35°C ± 2°C
0	2,88	2,88
1	3,19	0,7
2	3,14	0
3	2,92	0
4	2,72	0
Coefficiente angular	-0,0589	Não realizado
Limite inferior (95%)	-0,25654252	Não realizado
Limite superior (95%)	0,13854252	Não realizado

\*log<sub>10</sub> - logaritmo de base 10.

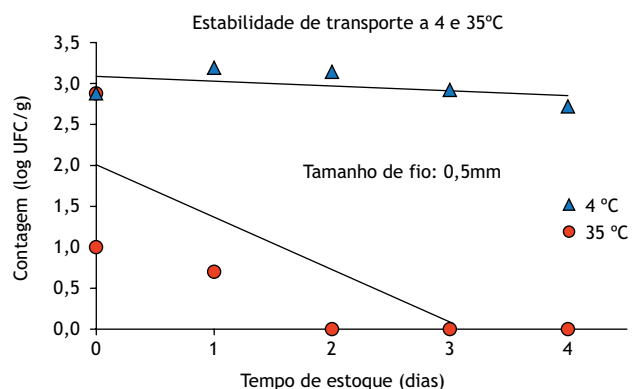


Figura 1. Variação da concentração de células do estudo de estabilidade em curto prazo durante quatro dias nas temperaturas de 4 ± 4°C e 35 °C ± 2°C.

Tabela 3. Resultado da média das contagens em Log<sub>10</sub> do estudo de estabilidade em longa duração durante cinco semanas a -20 °C ± 4 °C e durante 26 semanas a ≤ -70 °C.

Semanas	-20°C	-70°C
0	3,2	3,2
1	3,11	NR
2	2,92	2,89
3	3,11	NR
4	3	2,94
5	2,91	NR
6	NR	2,99
10	NR	3,21
14	NR	3,06
18	NR	3,09
22	NR	2,81
26	NR	3,13
Coefficiente angular	-0,0272	-0,0004

NR: Não Realizado.

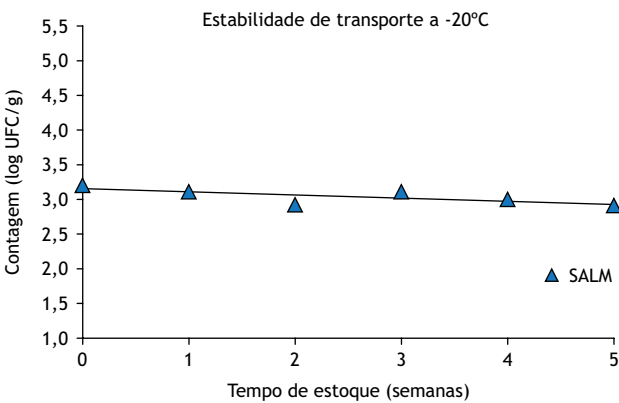


Figura 2. Variação da concentração de células do estudo de estabilidade em longa duração à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  durante cinco semanas.

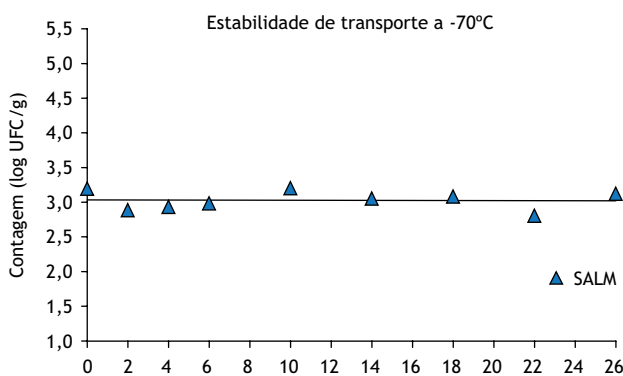


Figura 3. Variação da concentração de células do estudo de estabilidade em longa duração estocado à temperatura de  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  durante 26 semanas.

Após a análise de tendência do gráfico (Figura 1), constatou-se que o lote não foi suficientemente estável na temperatura de  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pois é possível observar claramente o decréscimo da concentração celular já no segundo dia, ocorrendo no terceiro dia ausência de crescimento no volume plaqueado. Isso pode ter ocorrido devido a ação de componentes da matriz sobre o micro-organismo, uma vez que outros estudos com outras as matrizes queijo e carne bovina foram considerados suficientemente estáveis a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ <sup>13,14,16,18</sup>. Na temperatura de  $4 \pm 4^{\circ}\text{C}$ , como não foi evidenciada tendência na análise do

gráfico (Figura 1), foi realizado o teste de regressão linear, e o lote foi considerado suficientemente estável uma vez que o intervalo de confiança a 95% abrange o valor zero (Tabela 2). Em matriz queijo, Costa et al.<sup>13</sup> avaliaram um lote de IE para *Salmonella* spp., durante seis dias, identificando que esse foi estável a  $4^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  e  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Também em matriz queijo, Brandão et al.<sup>18</sup> estudaram em seis dias a estabilidade dos lotes de IE produzidos para coliformes, verificando que esses foram suficientemente estáveis a  $4^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

O lote de IE foi considerado suficientemente estável a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  e a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  de acordo os cálculos estatísticos preconizados pela ABNT ISO GUIA 35<sup>22</sup>.

Costa et al.<sup>13</sup> avaliaram a estabilidade em longa duração de um lote de IE para *Salmonella* spp., identificando que este apresentou estabilidade durante os 168 dias (24 semanas) de estudo. Lotes de IE produzidos para *Salmonella* spp. e *S. aureus* também tiveram sua estabilidade em longo prazo estudada por Rosas et al.<sup>27</sup>, que verificaram que esses se mantiveram estáveis quando estocados por até 3 meses (aproximadamente 13 semanas) a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ .

É importante a obtenção de IE suficientemente estáveis em longa duração a temperaturas superiores a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ , pois nem todos os laboratórios podem estocar o IE nessa temperatura de referência<sup>29</sup>. O presente estudo utilizou a trealose como crioprotetor visando proporcionar maior estabilidade dos micro-organismos na matriz.

## CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, a técnica de liofilização se mostrou eficaz para dessecação dos IE produzidos em matriz chocolate granulada, apresentando resultados satisfatórios no controle do vácuo. O uso de trealose no preparo dos lotes se mostrou adequado como crioprotetor dos IE produzidos por liofilização.

O lote de *Salmonella* spp. foi considerado estável a  $4^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  por 4 dias, a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  durante cinco semanas e a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  durante 26 semanas.

O lote de IE em matriz chocolate granulada produzido nesse estudo apresentou qualidade que o torna apto para uso em EP, contribuindo com o gerenciamento da qualidade no controle microbiológico do chocolate.

## REFERÊNCIAS

1. Donovan J. Diversification in International Cacao Markets: opportunities and challenges for smallholder cacao enterprises in Central America. Costa Rica: Turrialba; 2006.
2. Escalando o pódio: terceiro maior produtor mundial, Brasil persegue vice-liderança na fabricação de chocolate. Doce Revista. 2014[acesso 4 maio 2015];242:10-12. Disponível em: [http://docerevista.com.br/PDF/edicoes/doce\\_242.pdf](http://docerevista.com.br/PDF/edicoes/doce_242.pdf)
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus anexos I e II. Diário Oficial União. 2 jan 2001.
4. Food Safety Authority of Ireland. *Salmonella* species. Dublin: Food Safety Authority of Ireland; 2011. (Microbial factsheet series, vol 1).
5. Portal da Saúde SUS. Doenças transmitidas por alimentos (DTA): descrição da doença. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2015 [acesso 8 out 2015]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/653-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta/11216-descricao-da-doe>





6. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Foodborne outbreak tracking and reporting [acesso 8 ago 2015]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/fdoss/overview/index.html>
7. Ministério da Saúde (BR). Departamento de Vigilância Epidemiológica - DEVIT. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis - CGDT. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos - VE-DTA. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2014[acesso 8 ago 2015]. Disponível em: [http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)
8. Branco NMC. Avaliação da utilização do sistema notivisa pelo INCQS e pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública no ano de 2008 [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2010.
9. Cardoso MHW. Preparação de um Material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros [tese]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2008.
10. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. Norma ABNT ISO/IEC 17.025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2005.
11. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. ABNT ISO/IEC 17.043. Avaliação de conformidade: requisitos gerais para ensaios de proficiência Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2011.
12. Sá A, Albuquerque C, Bottino L. Ensaio de proficiência. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do Laboratório: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: Control Lab; 2011. Vol 2, p. 47-97.
13. Costa JCB, Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Medeiros VM, De la Cruz MHC et al. Preparo de itens de ensaio de proficiência em matriz queijo para a pesquisa de *Salmonella* spp. *Vigil Sanit Debate*. 2015;3(3):11-8. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00367>
14. Brandão MLL, Costa JCB, Farias FM, Rosas CO, Bricio S ML, Nascimento JS et al. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. *Braz J Food Technol*. 2013;16(1):73-9. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232013005000006>
15. Alcarde AR, Basso LC. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Sci Agric*. 1997;54(3):189-94. <https://doi.org/10.1590/S0103-90161997000200013>
16. Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Vieira LR, Medeiros VM et al. Avaliação de matrizes de carne bovina na produção de itens de ensaio de proficiência para pesquisa de *Salmonella* spp. *Alim.Nutr*. 2014;25(1):13-8.
17. Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Medeiros VM, Warnken MB et al. Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2013;72(2):124-30.
18. Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Medeiros VM, Costa JCB, Pinheiro RR et al. Preparation of reference material for proficienc test for enumeration of coliforms in cheese matrix. *Detection*. 2013;(1):7-12. <https://doi.org/10.4236/detection.2013.11002>
19. Colla E. Seleção de leveduras produtoras de trealose e otimização da produção utilizando estratégias sequenciais de planejamento experimental [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2008.
20. Welsh DT, Herbert RA. Osmotically induced intracellular trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letters*. 1999;174(1):57-63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13549.x>
21. Andrews WH, Jacobson A, Hammack T. *Salmonella*. In: U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual online. Silver Spring: U.S. Food and Drug Administration; 2011[acesso 20 dez 2015]. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>
22. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. ABNT ISO GUIA 35: Materiais de referência - princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2012.
23. Reolon EM, Santos ARB, Moreira VE, Nascimento MS. Pesquisa de enterobactérias em chocolates. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71(1):40-3.
24. Brant LMF, Fonseca LM, Silva MCC. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro - MG. *Arq Bras Med Vet.Zootec*; 2007;59(6):1570-4.
25. Cunha IC, Correia CB, Saraiva M, Pena C, Faria AP, Calhau MA. Programa nacional de avaliação externa da qualidade em microbiologia de alimentos: 13 anos de ensaios interlaboratoriais. Brasília, DF: Instituto Nacional de Saúde; 2015.
26. Rosas CO. Produção de Materiais de referência para ensaios de proficiência em microbiologia de alimentos [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2009.
27. Rosas CO, Brandao MLL, Bricio SML, Medeiros VM, Bernardo SPC, De La Cruz MHC et al. Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):15-22.
28. Schulten SM, In't Veld PH, Ghameshlou Z, Schimmel H, Linsinger T. The certification of the number of colony forming particles of *Salmonella typhimurium* and number fraction of negative capsules from artificially contaminated milk power: CRM 507R. Belgium: European Commission; 2000.
29. Brandão MLL. Produção de material de referência em matriz queijo para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia; 2012.



---

#### Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pela bolsa de mestrado recebida por Maria Luiza Cabral da Silva. Ao CNPq, pela concessão de bolsa a Cátia Cardoso da Silva e Rodrigo Domingos Overa Tavares.

#### Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.  
Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).