

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO DE
PROTEÍNA DE SOJA PELA METODOLOGIA ISOTÓPICA ($\delta^{13}\text{C}$ E
 $\delta^{15}\text{N}$) EM HAMBÚRGUERES BOVINOS DE MARCAS
COMERCIAIS BRASILEIRAS

RHANI DUCATTI

Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE
SOJA PELA METODOLOGIA ISOTÓPICA ($\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$) EM
HAMBÚRGUERES BOVINOS DE MARCAS COMERCIAIS BRASILEIRAS**

RHANI DUCATTI

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. José Paes de Almeida
Nogueira Pinto
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lea Silvia
Santana

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651**

Ducatti, Rhani.

Análises microbiológicas e quantificação de proteína de soja pela metodologia isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) em hambúrgueres bovinos de marcas comerciais brasileiras : qualidade higiênico-sanitária e adulteração em hambúrgueres / Rhani Ducatti. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Coorientador: Lea Silvia Santana

Capes: 50505009

1. Alimentos de origem animal - Adulteração e inspeção. 2. Carne bovina - Contaminação. 3. Carnes - Inspeção. 4. Isótopos estáveis. 5. Microbiologia. 6. Vigilância sanitária.

Palavras-chave: Adulteração; Hambúrguer bovino; Isótopos estáveis; Microbiologia.

Nome do Autor: Rhani Ducatti

Título: ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE SOJA PELA METODOLOGIA ISOTÓPICA ($\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$) EM HAMBÚRGUERES BOVINOS DE MARCAS COMERCIAIS BRASILEIRAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Marcelo Zacharias Moreira
Membro
Divisão de Funcionamento de Ecossistemas Tropicais
USP – Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) – Campus Luiz de Queiroz- Piracicaba

Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim
Membro
Médico Veterinário, Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Chefe da Unidade Técnica Regional do Ministério da Agricultura

Data da Defesa: 27 de junho de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao meu anjo da guarda, meu zeloso guardador. Obrigada por guiar os meus passos e iluminar os meus pensamentos.

Aos funcionários do Centro de Isótopos Estáveis, em especial à Mariana, Sílvia, Juliana, Cibele e Evandro, colegas estimados e queridos por mim.

A todos os funcionários, estagiários, residentes e professores do Serviço de Orientação e Inspeção Pública (SOAP). Especialmente, os amigos Julia Arantes Galvão e Ricardo Seiti Yamatogi, por me estenderem as mãos gentilmente no momento que mais precisei. Obrigada pelo apoio, ensinamentos e amizade.

À professora Maria Márcia Pereira Sartori, por ter realizado as análises estatísticas deste trabalho. Obrigada pela compreensão e superação das intemperanças do caminho.

À CAPES e à FAPESP, pela bolsa e auxílio concedidos para a realização das análises, aquisição de materiais, participação em congressos e conclusão do Mestrado.

A minha mãe, pelo incentivo, apoio emocional e amparo financeiro. Sem ela, o término desta pesquisa não teria sido concluído com sucesso.

Ao meu pai, meu maior exemplo de profissional dedicado ao trabalho e pesquisador consagrado. Obrigada pelo estímulo à pesquisa e fomento a minha carreira como Médica Veterinária.

Aos meus amigos e familiares. Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão. Obrigada por me ajudarem a seguir e trilhar esta destinada jornada acadêmica.

Ao meu namorado e designer, pela contribuição à parte visual e harmonização entre texto e imagem. Entre todas as minhas dúvidas e devaneios sobre o futuro, a única certeza que possuo é sobre o amor que sinto por ti. Obrigada pela paciência, carinho e companheirismo. Desde sempre, amo você.

E por fim, ao meu orientador, José Paes de Almeida Nogueira Pinto, um ser humano alegre, atencioso e especialmente generoso. Sempre muito prestativo e disposto a me estender a mão desde o começo deste projeto. Como diriam os *Beatles*, “*Let it be, let it be. Let it be, let it be. Whisper words of*

wisdom. Let it be". O meu muito obrigado pelas palavras de sabedoria. Deixe estar.

“E se arte fosse ilusão?
E se fosse possível prever o futuro?
E se o universo tivesse onze dimensões?
E se ciência e religião fizessem as pazes?
E se?
Questione.
Descubra.
Mude.
O conhecimento é irresistível.”
(Canal Futura – Campanha publicitária)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Consumo de produtos cárneos congelados no Brasil em volumes....	7
Tabela 2 – Padrões microbiológicos para hambúrgueres.....	8
Tabela 3 - Abundância natural dos isótopos estáveis dos elementos C, H, O, N e S e suas moléculas gasosas.....	21
Tabela 4 - Exemplos de plantas do Ciclo Fotossintético C ₃ e C ₄	23
Tabela 5 - Razão isotópica absoluta dos padrões internacionais.....	27
Tabela 6- Valores dos $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos ingredientes adicionados aos hambúrgueres, da soja, dos cortes filé <i>mignon</i> e fraldinha e das amostras controle 100% carne e 100% soja.....	30
Tabela 7- Marcas, local de produção, data de fabricação e nº de lotes das 10 marcas comerciais de hambúrgueres bovinos analisados.....	31
Tabela 8 - Dados médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e seus desvios-padrão das marcas comerciais dos hambúrgueres.....	40
Tabela 9 - Porcentagens médias de proteína de soja e de carne das 10 marcas comerciais brasileiras nos hambúrgueres bovinos.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Interpretação figurativa da régua isotópica com escala de δ	26
Figura 2- Diagrama esquemático dos componentes do espectrômetro de massas.....	35
Figura 3- Régua isotópica com escala de $\delta^{13}\text{C}$: amostra em relação ao padrão internacional.....	41
Figura 4- Variação de valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ conforme a posição ocupada na cadeia alimentar.....	42
Figura 5 - Áreas de aceite, rejeição e incerteza da adição de 4% de proteína de soja em hambúrgueres.....	44
Figura 6 - Reta padrão a partir dos dados isotópicos de Carbono e Nitrogênio das amostras controles de carne e soja.....	47
Figura 7- Modelo do sistema de equações.....	48
Figura 8- Reta padrão a partir dos dados isotópicos de Carbono e Nitrogênio das amostras controles de carne e soja e análise das amostras de hambúrgueres comerciais.....	49
Figura 9- Análise de Componentes Principais para os valores do par isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras de hambúrgueres.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Carne.....	4
2.2 Hambúrguer.....	5
2.3 Microbiologia.....	8
2.3.1 <i>Clostridium</i> sulfito redutor a 46°C.....	10
2.3.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	12
2.3.3 Coliformes a 45°C.....	13
2.3.4 <i>Salmonella</i> spp.....	15
2.4 Proteína de soja.....	17
2.5 Isótopos estáveis.....	20
3 OBJETIVOS.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Análises microbiológicas.....	31
4.1.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	32
4.1.2 Contagem de Coliformes a 45°C.....	32
4.1.3 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	33
4.1.4 Contagem de <i>Clostridium</i> sulfito redutor a 46°C.....	33
4.2 Análises isotópicas.....	34
4.2.1. Metodologia isotópica.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. Análises microbiológicas.....	36
5.2. Análises isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$	39
5.2.1. Determinação da área de legalidade e avaliação das amostras.....	43
5.2.2. Determinação da porcentagem de carne nas amostras de hambúrgueres comerciais bovinos.....	47
5.2.3. Análise de Componentes Principais (PCA).....	51
6 CONCLUSÕES.....	52
7 BIBLIOGRAFIA.....	53

DUCATTI, R. **Análises microbiológicas e quantificação de proteína de soja pela metodologia isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) em hambúrgueres bovinos de marcas comerciais brasileiras**. Botucatu, 2014. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O hambúrguer é um produto cárneo industrializado e potencial veículo de bactérias produtoras ou não de toxinas nas diversas fases de seu processamento, desde sua origem até as fases de transformação, armazenagem, transporte e distribuição para o consumo. Além disso, seus requisitos de composição são susceptíveis à fraude pelo uso excessivo de extensores protéicos. Estes ingredientes auxiliam na diminuição nos custos de formulação dos produtos finais e maximizam os lucros de indústrias fraudulentas. A fiscalização pelos órgãos de vigilância é dificultada pela carência de metodologias analíticas apropriadas. Dentro deste contexto, torna-se necessária a avaliação do aspecto higiênico-sanitário dos hambúrgueres através das análises microbiológicas e a determinação e quantificação da proteína de soja. Foram analisadas 110 amostras de hambúrgueres de carne bovina de 11 marcas comerciais brasileiras através da técnica dos isótopos estáveis de Nitrogênio -15 e Carbono-13 e segundo a metodologia microbiológica descrita pela Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Todas as 11 marcas comerciais brasileiras apresentaram contagem bacteriana dentro do limite (5×10^3 UFC/g) para Coliformes a 45°C, enquanto os valores para *Staphylococcus* coagulase positiva estavam acima dos padrões permitidos (5×10^3 UFC/g) na marca H (amostras 1 e 7). As marcas B (amostra 5), D (amostra 5), E (amostra 5) e G (amostra 4) também apresentaram contagens acima do estipulado (3×10^3 UFC/g) para *Clostridium* sulfito redutor a 46°C e a amostra 6 da marca L foi positiva para *Salmonella* spp. Apenas 3 amostras da marca G encontraram-se dentro dos 4% de adição de proteína não cárnica estipulados pela IN nº 20 de 31/07/2000. Todas as outras 107 amostras das 11 marcas comerciais burlaram a legislação específica em vigor.

Palavras-chave: hambúrguer bovino, microbiologia, isótopos estáveis, adulteração

DUCATTI, R. **Microbiological analysis and quantification of soy protein using the isotope method ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) for commercial brands of beef hamburger.** Botucatu, 2014. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The burger is a manufactured meat product and potential vehicle of bacteria producers or not of toxins in various stages of processing, from its origin to the stage of transformation, storage, transport and distribution to consumption. Moreover, their composition requirements are susceptible to fraud by excessive use of protein extenders. These ingredients help in reducing the cost of formulation of the final products and maximize profits of fraudulent industries. The supervisory agencies monitoring is hindered by the lack of appropriate analytical methodologies. Within this context, it is necessary to evaluate the hygienic- sanitary aspects of burgers through microbiological analysis and the determination and quantification of soy protein. Were analyzed 110 samples of beef hamburgers of 11 brazilian trademarks by the technique of stable isotopes of Nitrogen-15 and Carbon -13 and second microbiological methodology described by Normative Instruction n° 62 of August 26, 2003. All 11 brazilian trademarks presented bacterial counts within the limit (5×10^3 CFU/g) for coliforms at 45°C , while the values for *Staphylococcus* coagulase positive were above the allowed patterns (5×10^3 CFU/g) in brands H (samples 1 and 7). Brands B (sample 5) , D (sample 5) , E (sample 5) and G (sample 4) also had scores above the stipulated (3×10^3 CFU/g) for *Clostridium* sulphite reducing to 46°C and sample 6 of brand L was positive for *Salmonella* spp. Only 3 samples of G brand were within 4% addition of non-meat protein stipulated by IN 20 07/31/2000. All other 107 samples from 11 trademarks cheated the specific legislation.

Key words: beef burger, microbiology, stable isotopes, adulteration

1. INTRODUÇÃO

A carne é um dos alimentos mais consumidos no mundo por ser uma das principais fontes de nutrientes essenciais e proteínas de alto valor biológico. A importância nutricional e as exigências do consumidor moderno estimularam a elaboração de produtos cárneos em grande escala, preço acessível e de fácil preparo.

Diante deste contexto, o hambúrguer tornou-se um produto muito popular na rotina alimentar das grandes cidades e, em consequência desta demanda, vem se destacando como um dos congelados mais vendidos nos mercados brasileiro e mundial.

Este industrializado é obtido da carne moída de animais de açougue, adicionado ou não de outros ingredientes, moldado e submetido a processos tecnológicos adequados. Durante o processamento tecnológico de elaboração de hambúrgueres, etapas como a pesagem, moagem, mistura, congelamento e embalagem envolvem operações de risco susceptíveis aos perigos microbiológicos.

Dentre todos os micro-organismos possivelmente presentes no hambúrguer, destacam-se as bactérias, pois estas podem participar dos processos de deterioração, infecção e intoxicação alimentar. Algumas delas são indicadores higiênicos- sanitários, os quais permitem avaliar a qualidade do alimento. Estes micro-organismos indicadores podem fornecer informação sobre contaminação de origem fecal, presença de patógenos ou deteriorantes, indicando também condições diversas durante processamento, produção ou armazenamento do produto.

O hambúrguer pode ser contaminado por micro-organismos como, por exemplo, coliformes, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* enterotoxigênico e *Clostridium perfringens*. Dependendo da sua origem, manipulação ou conservação, a carne bovina pode servir de veículo para bactérias produtoras ou não de toxinas, desencadeando graves problemas à saúde pública e prejuízos econômicos ao país.

Considerando-se tais características, torna-se necessária a avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos hambúrgueres do ponto de vista microbiológico e a adoção de práticas adequadas para sua conservação e preparação, a fim de garantir que o consumo ocorra de forma segura e livre de contaminação.

No Brasil, salienta-se que são escassas as referências com relação ao número de casos e surtos de enfermidades associados ao consumo de hambúrgueres produzidos e consumidos em nosso país. Assim, julga-se importante a realização de pesquisas que possam contribuir com informações sobre a qualidade destes produtos.

Os resultados microbiológicos contribuirão para a formação de uma base de dados que poderá ser empregada em estudos futuros de análise de risco envolvendo o consumo de hambúrgueres brasileiros.

A análise de risco contribui para a produção de alimentos seguros, sendo uma ferramenta para o gerenciamento e a definição de medidas transparentes e coerentes, para a avaliação de perigos específicos e técnicas para uma comunicação e discussão eficiente entre os profissionais e com a sociedade.

Para muitos consumidores, existe uma associação entre a qualidade do hambúrguer e o seu preço, isto é quanto mais caro o produto, maior a sua qualidade e vice-versa. Contudo, sabe-se que a relação preço-qualidade nem sempre é diretamente proporcional. Produtos mais caros, vendidos muitas vezes como se fossem elaborados unicamente de carnes nobres, podem apresentar em sua composição vísceras, ligamentos e, especialmente, proteína não cárnica, sem que estes sejam discriminados e declarados no rótulo.

Extensores (proteínas não cárnicas) podem ser definidos como proteínas alternativas ou misturas de proteínas que substituem, em parte, as proteínas naturais da carne, contribuindo para a obtenção de produtos de qualidade similar. Os extensores são ingredientes opcionais que melhoram a estabilidade da emulsão e aumentam o rendimento de fabricação, o que contribui para a diminuição nos custos de formulação dos produtos finais.

No Brasil, há ampla disponibilidade de extensores, sendo comum a combinação de proteínas não cárnicas com gomas e fosfatos. Contudo, a soja e seus derivados têm recebido atenção especial devido à quantidade e à

qualidade de sua proteína, sendo considerada, dentre os vegetais, o melhor substituto de produtos de origem animal.

Embora a categoria “extensores” não tenha sido prevista no regulamento brasileiro de aditivos para carnes e produtos derivados, a porcentagem máxima de 4% de proteínas não cárnicas em produtos cárneos está prevista nos seus respectivos regulamentos técnicos de identidade e qualidade. Porém, a fiscalização pelos órgãos de vigilância é dificultada pela carência de metodologias analíticas adequadas, a qual confere oportunamente a possibilidade de fraude pelas empresas.

Entre as técnicas que se pode empregar para avaliar a qualidade do hambúrguer, destaca-se a análise da variabilidade natural dos isótopos estáveis de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e Nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), uma vez que estes apresentam diferença isotópica com relação a plantas do ciclo fotossintético C_3 (leguminosas, soja, gramíneas temperadas) e C_4 (cana-de-açúcar, milho, gramíneas tropicais) e ao nível trófico, respectivamente. Por consequência, existe a possibilidade de usar essa metodologia para quantificar a presença de proteína de soja nos produtos finais oferecidos ao consumidor. Este processo envolve um sistema de equações que, na mensuração do Carbono e do Nitrogênio, apresenta padrões que são diferentes, caso o hambúrguer apresente valores mais elevados de adição de proteína de soja do que o permitido pela Instrução Normativa em questão.

Com os resultados, pode-se indicar se os hambúrgueres estão infringindo a legislação brasileira específica. Desta forma, confere-se um respaldo ao consumidor, o qual poderá estar sendo lesado, pagando altos preços por proteína animal, mas levando um produto de qualidade inferior.

Os dados fornecidos por este trabalho também poderão constituir um apoio valioso para os consumidores, dando-lhes a oportunidade de conhecer a composição correta do alimento, a segurança quanto à ingestão de nutrientes, bem como informações importantes para a manutenção de sua saúde. A declaração fidedigna dos constituintes de um alimento nos rótulos dos alimentos é um direito assegurado pelo Código de Defesa do Consumidor, constituindo-se em uma arma eficiente contra abusos cometidos pelas empresas e pelos prestadores de serviços. Contudo, para que o consumidor utilize este documento como instrumento de cidadania, é indispensável que a

população esteja informada sobre as fraudes nos hambúrgueres, para que possa agir de forma correta nas reivindicações de seus direitos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Carne

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil é dono do segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. Além disso, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (BRASIL, 2014).

Com o crescimento das exportações brasileiras e as possibilidades abertas em mercados usualmente não atendidos pelo país, mostrou-se apropriada a atualização de estudos mais amplos com o levantamento de informações disponíveis sobre a carne bovina no Brasil (BRASIL, 2007).

A carne bovina é classificada como carne vermelha, possuindo grande importância nutricional, pois fornece os principais nutrientes necessários para as dietas balanceadas (SARCINELLI et al, 2007). É uma excelente fonte de proteínas de alto valor biológico, rica em ácidos graxos essenciais, em vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, ácidos fólico e pantotênico e vitaminas B₆ e B₁₂), em minerais (K, P, Mg, Fe e Zn) e em aminoácidos essenciais (VALLE, 2000).

A proteína é o componente mais relevante da carne, não só pela quantidade, mas devido ao seu importante aspecto nutricional. As proteínas de origem animal possuem, devido a sua composição em aminoácidos, um valor biológico mais elevado que as de origem vegetal (ROÇA, 2014). Essa habilidade de fornecer aminoácidos essenciais em altas porcentagens faz da carne um alimento de imenso valor biológico (BRESSAN et al., 1999).

Com a industrialização da carne, surgiu uma alternativa para o aproveitamento dos cortes menos nobres, operação que aumentou o lucro das empresas comerciais. A diversificação da oferta incluiu um grande número de

produtos, como almôndegas, hambúrgueres, empanados, linguiças, mortadelas e salames. Especial atenção tem sido dada aos alimentos com menor tempo de preparo, preço acessível, sabor agradável e boa qualidade (COSTA, 2004).

À medida que ocorreram alterações de hábitos, gostos e preferências, os consumidores aumentaram suas exigências e o conceito de qualidade do produto ganhou mais relevância (SAAB, 1999). A exigência da carne e seus derivados com qualidade satisfatória têm aumentado devido à conscientização dos consumidores em relação a sua importância como alimento (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

Para se analisar a carne e seus produtos derivados expostos à comercialização, torna-se necessário conhecer suas características físico-químicas, organolépticas e nutricionais, bem como as condições de higiene, conservação, exposição e comercialização (GILL et al., 1996; HEUVELINK et al., 2001; MENDES et al., 2001).

No Brasil, a RDC nº12/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001) estabelece parâmetros que regulamentam os padrões microbiológicos de carnes e produtos cárneos e as ações de controle sanitário destes alimentos, as quais visam à proteção da saúde da população. Os consumidores também encontram respaldo no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Hambúrguer (BRASIL, 2000) que institui medidas que garantem uma padronização dos produtos elaborados a partir de diferentes fabricantes, bem como asseguram a transparência na produção, processamento e industrialização dos hambúrgueres.

2.2. Hambúrguer

O hambúrguer tem feito parte do hábito alimentar da população brasileira e de muitos outros países, por ser um produto de fácil preparo e em virtude de suas características sensoriais positivas, bem como pelo elevado teor de lipídeos, proteína de alto valor biológico, vitaminas e minerais em sua composição (QUEIROZ et al., 2005a).

Mediante a importância do consumo de carne e em decorrência de demandas geradas pelo novo modo de vida urbano, o consumo nacional de

hambúrguer tem sido superior, em volume, ao de outros produtos cárneos congelados (NASCIMENTO; OLIVEIRA; NASCIMENTO, 2005).

A procura por alimentos semi-prontos cresceu rapidamente nos últimos anos devido sua conveniência, praticidade e facilidade no preparo. Entre estes alimentos, os produtos derivados da carne bovina são os mais populares, tais como os hambúrgueres que respondem por cerca de 40% destes produtos (NASCIMENTO; OLIVEIRA; NASCIMENTO, 2005).

Deve-se lembrar que o consumo destes tipos de alimentos industrializados tem aumentado de maneira assustadora, sendo que uma só rede de *fast food* vende anualmente mais de 100 bilhões de hambúrgueres no mundo todo, numa taxa de 75 hambúrgueres por segundo (SPENCER; FRANK; MCINTOSCH, 2005).

Pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer, “entende-se por hambúrguer o produto cárneo industrializado, obtido de carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado. Trata-se de produto cru, semi-frito, cozido, frito, congelado ou resfriado” de acordo com sua classificação (BRASIL, 2000).

O Código de Regulamentação Federal dos Estados Unidos define hambúrguer como: “bife de carne moída, fresco ou congelado, com ou sem adição de gordura e/ou condimentos, que não deve apresentar mais de 30% de gordura e não deve conter adição de água” (ROMANS et al., 1985). Já o regulamento brasileiro permite a adição de água como ingrediente opcional na composição do produto (BRASIL, 2000).

O hambúrguer deve ter como ingrediente obrigatório, carne de diferentes espécies de animais de açougue (BRASIL, 2000). Segundo Hoogenkamp (1996), os mais populares são aqueles constituídos de carne bovina, com consumo estimado em cerca de 50% do consumo total mundial de carne bovina.

De acordo com o Instituto AC Nielsen (2003), o brasileiro consumiu cerca de 42 mil toneladas de hambúrgueres em 2003. A Tabela 1 mostra o consumo de produtos cárneos congelados, acumulado dos meses de dezembro a maio dos anos 2005 e 2006. Destaca-se o hambúrguer como o mais consumido dentre os produtos (PERDIGÃO, 2006).

TABELA 1. Consumo de produtos cárneos congelados no Brasil em volumes

PRODUTOS	2005 (%)	2006 (%)
Hambúrgueres	41,2	40,2
<i>Nuggets</i>	22,9	21,7
Almôndegas	2,4	2,2
<i>Steak</i>	16,3	18,7
Cortes	9,9	9,9
Kibes	2,4	2,1
Outros	4,9	5,2

FONTE: PERDIGÃO (2006).

Os ingredientes opcionais incluem gordura animal, vegetal, água, sal, proteínas (animal e/ou vegetal), leite em pó, açúcares, maltodextrina, aditivos intencionais, condimentos, aromas e especiarias, além de vegetais, queijos e outros recheios (BRASIL, 2000).

A carne moída do hambúrguer pode, portanto, ser adicionada de proteína de soja hidratada, 1% de sal, 0,2% de glutamato monossódico e especiarias (PARDI et al., 2001). Porém, de acordo com os requisitos de composição (BRASIL, 2000) só é permitida a “adição máxima de 4,0% de proteína não cárnica na forma agregada”.

Além da IN nº20 de 31/07/2000 (BRASIL, 2000) estipular os padrões de qualidade dos hambúrgueres, a Resolução nº12/2001 da ANVISA também regulamenta os padrões microbiológicos para a comercialização destes produtos. Os parâmetros microbiológicos estabelecidos pela legislação estão apresentados na Tabela 2 (BRASIL, 2001).

TABELA 2. Padrões microbiológicos para hambúrgueres

Micro-organismo	Tolerância para a amostra indicativa
Coliformes a 45°C	5X10 ³
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g	5X10 ³
<i>Clostridium</i> sulfito redutor a 46°C/g	3X10 ³
<i>Salmonella</i> spp/25g	Aus.

Fonte: ANVISA (BRASIL, 2001).

Tais parâmetros baseiam-se no conhecimento da ecologia microbiana para que sejam estabelecidos os limites de tolerância ou valores máximos admissíveis para cada produto. A análise microbiológica é que vai determinar se o produto está ou não adequado do ponto de vista higiênico-sanitário (MUNUERA et al., 1997; TAUXE, 2002).

2.3. Microbiologia

A qualidade higiênico-sanitária de alimentos de origem animal sempre foi alvo de preocupação e destaca-se pela veiculação de micro-organismos patogênicos (NASCIMENTO; NASCIMENTO, 2000). O controle higiênico-sanitário desempenha um importante papel na prevenção de doenças veiculadas por alimentos e conseqüentemente, na proteção da saúde do consumidor.

Alguns atributos da carne são facilmente percebidos pela maioria dos consumidores como a cor, o odor, a textura, o sabor, porém outros não são tão claramente observados, como por exemplo, a qualidade microbiológica. A avaliação da qualidade microbiológica das carnes está baseada em parâmetros higiênicos - sanitários, os quais permitem uma análise global da matéria-prima usada, da higiene e limpeza durante o processamento e da provável vida útil do produto final. Os parâmetros das condições sanitárias têm relação direta com a

presença de contaminantes microbiológicos potencialmente patogênicos (CONTRERAS, 2002).

A contaminação de produtos de carne moída – especificamente do hambúrguer bovino – por bactérias patogênicas pode ocorrer durante o abate, a moagem, o processamento, o armazenamento, a distribuição e a cocção (CASSIN et al., 1998; CDC, 1993; SILVA JUNIOR, 2001).

Para análise da qualidade do alimento produzido e para determinar a sua vida comercial, utiliza-se a determinação de micro-organismos ditos como indicadores higiênicos - sanitários (MARCHI, 2006).

A presença desses indicadores sugere manipulação excessiva ou inadequada da carne, condições precárias de higiene, condições inadequadas de temperatura de armazenamento, manejo inadequado por parte dos manipuladores e contaminação proveniente do processo de abate (KASNOWSKY, 2004); ou ainda, resultado de limpeza inadequada dos equipamentos, situação que permite permanência e multiplicação dos micro-organismos (CUNHA, 2006).

A carne bovina é um dos alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares, já que além de estar entre os alimentos mais consumidos pela população, propicia aos micro-organismos um excelente habitat para seu desenvolvimento, veiculando principalmente clostrídios, estafilococos e enterobactérias (PANETTA, 1994; HOBBS; ROBERTS, 1999; GERMANO; GERMANO, 2001).

O hambúrguer e outros produtos cárneos cozidos são apontados como veículos em surtos alimentares provocados por *Staphylococcus aureus* (CARMO et al., 1995) e por *Clostridium perfringens* (CDC, 1994). Estes produtos também estão relacionados a surtos de colites hemorrágicas causadas por *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇, de gastroenterites por *Salmonella* sp., e tem contribuído por elevar consideravelmente a frequência de toxinfecções alimentares a nível mundial (TAVARES, 2003). O risco torna-se ainda maior quando este produto é consumido por crianças, idosos e pessoas imunossuprimidas, que podem sofrer vários danos à saúde, inclusive com risco de morte (SOCKETT, 1995; MORRIS, 1996).

A política de avaliação de risco constitui-se de uma série de guias documentadas que vão orientar as tomadas de decisão realizadas na

avaliação, seguindo critérios científicos (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003). A produção e aplicação da análise de risco permitem o diagnóstico de problemas e a definição de soluções mais específicas e eficientes para enfrentar o problema (FAO, 2005).

Uma das qualidades importantes da avaliação de riscos microbiológicos é sua capacidade de quantificar os perigos através da cadeia de produção alimentar e associar diretamente a probabilidade da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (BRASIL, 2008).

Assim, como outros produtos cárneos, os hambúrgueres quando mal cozidos ou manipulados de forma errônea, podem se tornar importantes veículos de agentes patogênicos, tais como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*, causando colites hemorrágicas, gastroenterites e outros surtos de toxinfecções (TAVARES; SERAFINI, 2003).

2.3.1. *Clostridium* sulfito redutor a 46°C

As bactérias do gênero *Clostridium* são bastonetes Gram-positivos, anaeróbios que podem esporular em condições adversas. São encontradas nos mais variados ambientes como solo, pastagens, água doce e salgada, alimentos de origem vegetal e animal e podem ser habitantes normais do trato digestivo dos animais e de seres humanos (GONÇALVES, 2004).

O gênero *Clostridium* é composto por várias espécies, e cada uma delas é caracterizada por possuir um conjunto de fatores de virulência distinto. Entre essas espécies, destaca-se o grupo dos Clostrídios sulfito-redutores, que se caracteriza por reduzir o sulfito a sulfeto de hidrogênio (H₂S) a 46°C (SILVA, 2012). *Clostridium perfringens* é o representante mais característico do grupo dos clostrídios sulfito-redutores.

C. perfringens é classificado em cinco tipos toxigênicos, de A a E, dependendo da toxina produzida. No entanto, apenas os tipos A e C são comumente incriminados como causadores de infecções em humanos, sendo o tipo A, o principal causador da enfermidade em humanos via consumo de alimentos contaminados. A doença ocorre após a ingestão de grande número de células vegetativas, as quais esporulam no intestino. A toxinfecção alimentar

devido a cepas do tipo A tem sido mortal somente em idosos ou imunodeprimidos (LABBE, 1980; JAY, 1994; SIQUEIRA, 1995).

O tempo e a temperatura inadequados durante a cocção e o resfriamento lento podem permitir a germinação de esporos de *C. perfringens* tipo A e posterior multiplicação rápida de células vegetativas entre 40°C e 50°C (tempo de duplicação de menos de 10 minutos foi relatado em carne por Labbe e Huang, 1995).

Segundo Labbe (1991), a principal causa de todos os surtos de toxinfecções devido ao *C. perfringens* é a falha na refrigeração correta, posteriormente ao cozimento do alimento. Esporos na carne crua podem sobreviver ao cozimento, os quais efetivamente serão ativados no calor para promoverem a germinação quando o produto atingir a temperatura conveniente durante o resfriamento.

Algumas cepas de *C. perfringens* produzem uma potente enterotoxina, sobretudo quando o micro-organismo se multiplica em produtos cárneos moídos cozidos. Após a ingestão, formam-se esporos no intestino, e a seguir a enterotoxina provoca diarreia intensa em 6 a 18 horas, tendendo ser autolimitante (INGRAM; SIMONSEN, 1985; KONEMAN *et al.*, 2001).

Os esporos são eliminados nas fezes e dessa forma, chegam ao meio aquático, onde apresentam excepcional longevidade, em função da grande resistência a condições ambientais desfavoráveis. Por esse motivo, são úteis na detecção de contaminação fecal remota, em situações, nas quais outros indicadores, como *Escherichia coli* e *Streptococcus* de origem fecal, já não se encontrariam presentes (JUNQUEIRA; NETO; SILVA, 2006).

Clostridium perfringens é a espécie de grande importância para saúde pública, pois estes micro-organismos produzem várias substâncias solúveis de efeitos tóxicos. A toxintoxicação alimentar por tais bactérias é uma das Enfermidades Transmitidas por Alimentos mais comuns, principalmente aquelas causadas por produtos cárneos (FRANCO; LANDGRAF, 2004; FERNANDES; MIRANDA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

2.3.2. *Staphylococcus coagulase positiva*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae e pelo menos 40 espécies fazem parte desse gênero (BROOKS et al., 2012). Dessas, as consideradas importantes em microbiologia de alimentos são: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius* e *S. chromogens*. Entretanto, o *S. aureus* é o mais frequentemente associado às doenças estafilocócicas, provocadas pela ingestão do alimento com toxina pré-formada, as enterotoxinas A, B, C1, C2, C3, D, E, das quais há relatos de que os tipos A, B e C foram identificados em amostras de hambúrgueres (JARRAUD et al., 2001; SORIANO et al., 2002; LE LOIR et al., 2003).

A produção destas toxinas correlaciona-se com uma enzima que coagula o plasma sanguíneo. Tais bactérias são denominadas coagulase positivas. Não se pode atribuir a esta enzima um efeito patogênico direto, mas é de utilidade na identificação preliminar de cepas provavelmente virulentas. As estirpes coagulase positivas são consideradas potencialmente patogênicas (TORTORA et al., 1993).

Segundo Pearson e Dutson (1986), os estafilococos estão amplamente distribuídos na natureza e são capazes de crescerem em produtos cárneos de bovinos e de aves. Não são capazes de se multiplicarem em temperatura normal de refrigeração e regularmente quando se multiplicam em produtos cárneos, produzem somente pequenas alterações organolépticas (sensoriais). Embora, esta bactéria seja morta pelo cozimento ou processos de altas temperaturas, as enterotoxinas são resistentes a altas temperaturas.

Assim, a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em um alimento representa um risco à saúde pública, pois se as toxinas forem ingeridas, causarão intoxicação alimentar. Essas enterotoxinas são resistentes ao calor e à ação das enzimas intestinais (BROOKS et al., 2012), o que é de grande importância na indústria de alimentos, já que o aquecimento não garante a inativação da toxina previamente formada, mesmo que destrua a célula vegetativa, que, por sua vez, é sensível ao calor (APHA, 2001).

O período de incubação da enfermidade é, em média, de 1 a 6 horas após a ingestão do alimento. A intensidade dos sintomas é variável de acordo com o grau de suscetibilidade do indivíduo, concentração da enterotoxina no

alimento e a quantidade de alimento ingerido. Os principais sinais e sintomas são náuseas, vômitos, câibras abdominais geralmente dolorosas, diarreia e sudorese; a doença poderá ser fatal se o indivíduo estiver debilitado (SILVA JUNIOR, 2002).

Como micro-organismo indicador, os *Staphylococcus* coagulase positiva presentes no alimento indicam as condições higiênicas de seu processamento, incluindo a superfície de contato, a qual o alimento é exposto, e a participação do manipulador como fonte de contaminação, tendo em vista que esses micro-organismos têm como habitat natural as mãos, as fossas nasais e a boca dos seres humanos, entre outros locais (IARIA et al., 1980).

A presença de números elevados na contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos é uma indicação de perigo potencial à saúde pública, devido à enterotoxina estafilocócica, bem como à sanitização questionável, principalmente quando o processamento envolve a manipulação de alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

No período de 1993 a 2004, surtos de toxinoses causados por este patógeno, tendo a carne e o hambúrguer bovinos confirmados como veículos, foram evidenciados no Brasil (CÂMARA, 2002), nos EUA (OLSEN et al., 2000; CDC, 2004) e na Europa (LINDQVIST et al., 2001; ADAK et al., 2005).

Segundo Pereira et al. (1994), as intoxicações estafilocócicas são muito comuns no Brasil, sendo a maioria dos casos não investigada ou não notificada.

2.3.3. Coliformes a 45°C

Os coliformes são bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. Estas bactérias normalmente habitam os intestinos dos animais e sua presença na água indica a possibilidade de contaminação fecal e a possível presença de micro-organismos patogênicos, sendo classificados em totais e termotolerantes (CHRISTOVÃO, 1977).

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família Enterobacteriaceae, que inclui 44 gêneros e 176 espécies. No grupo dos coliformes totais estão apenas aquelas capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Mais de 20 espécies se encaixam

nessa definição, dentre as quais encontram-se tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também bactérias não entéricas (SILVA et al, 2007).

O grupo dos coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C, com produção de gás. Essa definição objetivou, em princípio, selecionar apenas as enterobactérias originárias do trato gastrointestinal (*E.coli*), porém, atualmente sabe-se que o grupo inclui membros de origem não fecal (cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella*). Em função disso, o termo coliformes fecais tem sido, gradativamente, substituído por coliformes termotolerantes (SILVA et al, 2007).

Portanto, não é correta a relação direta da presença de coliformes termotolerantes em alimentos e água com contaminação de origem fecal, o que levou à necessidade de modificar, na legislação brasileira, a denominação coliformes fecais para coliformes a 45°C. O Ministério da Saúde, através da Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) adotou a denominação coliformes a 45°C, considerando os padrões “coliformes de origem fecal” e “coliformes termotolerantes” como equivalentes a coliformes a 45°C.

Segundo Franco e Landgraf (2004), estes micro-organismos são grupos ou espécies que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, a provável presença de patógenos e/ou a deterioração potencial de um alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

A maioria dos coliformes é encontrada no meio ambiente e é destruída com certa facilidade pelo calor, um ponto importante no controle destes micro-organismos nos alimentos (FORSYTHE, 2005).

A presença de coliformes termotolerantes em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene e sanificação aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos (SILVA et al, 2007).

2.3.4. *Salmonella* spp.

Salmonella é uma bactéria móvel, na forma de bacilo, Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, que é caracterizada por um grupo de bacilos mesófilos não produtores de esporos, anaeróbios facultativos e, na sua grande maioria, produtores de gás a partir da glicose. São conhecidas duas espécies de salmonelas, a espécie *S. bongori*, de ocorrência rara e a *S. enterica*, com seis subespécies e cerca de 2610 sorovares (GUIBOURDENCHE et al., 2010). A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios, exceto *S. pullorum* e *S. gallinarum* (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

O esquema de Kauffman e White, bastante empregado nos dias atuais, propõe a divisão do grupo em sorogrupos e sorovares, com base na presença dos antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar) (TRABULSI et al., 1999; BELL; KYRIAKIDES, 2002). Este esquema é bastante importante do ponto de vista epidemiológico, pois permite estabelecer relações entre os sorotipos causadores de doenças em humanos e aqueles isolados a partir de animais e alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

A maioria dos sorotipos tem um espectro de hospedeiro amplo e, tipicamente, provocam gastroenterites (SILVA et al., 2007). O período de incubação da enfermidade é de 6 a 72 horas, seguida de febre, dor abdominal, náuseas, diarreia e vômito, acompanhada de dores de cabeça, podendo causar desidratação grave e letalidade entre 1% a 2% dos pacientes. Entretanto, geralmente, apresenta um curso benigno, e a recuperação clínica ocorre em poucos dias (ACHA; SZYFRES, 2003; FORSYTHE, 2005).

A identificação e subtipagem dos micro-organismos responsáveis por casos de diarreia são importantes ferramentas nos laboratórios de saúde pública. Podem auxiliar na identificação da fonte de contaminação, no controle de surtos e levar a uma redução nas taxas de transmissão (GUERRANT et al., 2001).

As doenças causadas por *Salmonella* costumam ser subdivididas em três grupos: a febre tifóide, causada pela *S. Typhi*, as febres entéricas, causadas por *S. Paratyphi* (A, B e C) e as enterocolites (ou salmoneloses), causadas pelas demais salmonelas (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

As salmonelas são ubiqüitárias, podendo estar presentes no solo, no ar, na água, em águas residuais, nos seres humanos, nos outros animais, nos alimentos, nas fezes, nos equipamentos. Entretanto, o seu habitat natural é o trato intestinal dos seres humanos e dos outros animais (SIQUEIRA, 1995).

A temperatura ótima de multiplicação é de aproximadamente 38°C e a temperatura mínima é de 5°C. São termoestáveis por não formarem esporos, podendo ser destruídas a 60°C, por 15 a 20 minutos. (FORSYTHE, 2005).

Coelho et al. (1984) verificaram a presença de *Salmonella* sp. em amostras de carne bovina moída, armazenadas a 0°C e -18°C, por 90 dias, indicando que esta bactéria sobrevive por longos períodos de armazenamento sob baixas temperaturas.

As salmonelas, transmitidas por alimentos, têm sido responsáveis por diversos surtos. Os produtos de origem animal têm sido os maiores responsáveis pelos surtos e seus problemas subsequentes, com grande número de hospitalizações, o que representa elevados custos econômicos e sociais. As salmonelas afetam principalmente indivíduos de faixas etárias extremas, idosos e crianças (PERESI et al., 1998).

O homem, manipulador de alimentos, é um importante elo na cadeia de transmissão da *Salmonella*. Uma vez infectado, pode desenvolver a doença ou tornar-se portador, que sem condições ideais de higiene, pode contaminar o alimento e causar problemas aos que, por ventura, vierem a ingerí-lo (ENVANGELISTA-BARRETO; VIEIRA, 2002).

A principal via de transmissão é fecal-oral, por intermédio de contato direto ou indireto com animais infectados ou pela ingestão de alimentos e água contaminados, estando dispersas amplamente em locais onde há a presença de animais e de dejetos (DAVIES, 2004). Entre os animais, a contaminação se dissemina durante o transporte, a permanência em locais fechados e durante o sacrifício (ICMSF, 1998).

Salmonella spp. é o agente etiológico que mais causa infecções entéricas nos animais produzidos para comercialização, o que acarreta custos para as indústrias alimentícias, causando riscos para a saúde do consumidor (TIROLI; COSTA, 2006).

Esta bactéria possui fundamental importância em saúde pública, pelo fato de ser patogênica ao ser humano e de se constituir num parâmetro

microbiológico de reconhecimento mundial para a detecção de contaminantes alimentares (VON RÜCKERT et al., 2006).

Segundo Pardi et al. (2001), o hambúrguer é um dos produtos mais incriminados em surtos de salmoneloses, sendo que um dos fatores contribuintes para esta ocorrência é o consumo de produtos crus ou mal cozidos contendo *Salmonella* spp. em níveis infectantes.

Para prevenir a salmonelose, deve-se obedecer aos princípios fundamentais para se evitar a contaminação de alimentos manipulados por pessoas doentes e ou portadoras, bem como aqueles provenientes de animais igualmente doentes ou portadores, não esquecendo as possibilidades da contaminação cruzada (PARDI et al., 2001).

A adoção de medidas de controle por órgãos governamentais e pelas indústrias de alimentos que têm investido em segurança alimentar durante a fabricação de produtos cárneos e também em educação alimentar para seus consumidores, resultou em uma redução de *Salmonella* em carnes e em hambúrgueres e, conseqüentemente, em maior prevenção das Enfermidades Transmitidas por Alimentos – ETA (CDC, 2004; RANGEL et al., 2005; USDA, 2005).

Esses dados comprovam que grande parte das ETA que ocorrem mundialmente poderia ser evitada se mais pesquisas fossem realizadas em benefício da segurança alimentar (CDC, 2004a; RANGEL et al., 2005; USDA, 2005).

2.4. Proteína de soja

A proteína de soja tem como características fundamentais a capacidade de reter água e emulsionar gordura, assegurando a estabilidade dos produtos. A mesma substitui parcialmente a carne e aumenta consideravelmente a capacidade de emulsão e liga, o que melhora as características de corte e fatiamento (PARDI et al., 2001).

A proteína isolada de soja é um bom agente ligante, funcionando na emulsão de maneira semelhante à proteína cárnica (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

Na indústria da carne, substâncias denominadas ligadoras, enchedoras, emulsionadoras e estabilizadoras são utilizadas com o propósito de aumentar a estabilidade de emulsão e o rendimento no cozimento, bem como incrementar as características de corte, de sabor e, principalmente, reduzir os custos de formulação (ITAL, 1981).

Em produtos cárneos, a proteína de soja melhora a textura e a capacidade emulsificante, intensifica sua aparência, firmeza, suculência, fatiabilidade e seu rendimento de cocção, além de reduzir o custo de formulação e substituir a gordura animal (CASTRO-RUBIO et al., 2005; XIONG, 2005). Os extensores aumentam o rendimento de fabricação, pois, no produto final, há acréscimo de peso em relação ao original (OLIVO, 2006).

Dentre os derivados de soja, a proteína texturizada de soja é a que tem sido mais utilizada, sendo considerada entre os vegetais, o melhor substituto de produtos de origem animal. Esta difusão foi devida ao elevado custo da carne para a industrialização, aliada à grande disponibilidade de soja em países como Estados Unidos, onde o processo de texturização foi desenvolvido. A texturização da proteína de soja resulta em um produto de sabor menos intenso e textura mais adequada para ser utilizada em diferentes produtos cárneos (ITAL, 1981).

É grande o número de produtos cárneos que usam proteínas de soja em suas formulações, como salsichas, mortadelas, presuntos, apresuntados, linguças e hambúrgueres (PARDI et al., 2001).

Produtos como hambúrgueres, contêm quantidades importantes de substâncias para aumentar o rendimento. Os produtos de soja diminuem significativamente a oxidação lipídica e a descoloração (VARNAN, 1998).

Lemaire (1978) relatou a incorporação de concentrado protéico de soja em hambúrgueres de carne bovina para melhorar a retenção de água e promover a suculência do produto.

Por outro lado, para indivíduos alérgicos, a ingestão de soja ou outras proteínas não cárneas podem representar risco, daí a importância do controle de sua utilização e da informação expressa no rótulo (MELLENTIN; GALENSA, 1999).

Considerando que alimentos que contenham alergênicos podem desencadear alergias mais graves, é possível afirmar que tais alimentos podem

ser considerados como um perigo para a saúde de pessoas que sofrem com alergia alimentar. Por este motivo, é de grande importância o gerenciamento e a declaração adequada destes ingredientes. A rotulagem dos alimentos deve ser clara, visando atender as necessidades de informação e proteção do consumidor (DELGADO, 2011).

O desenvolvimento de diferentes técnicas para a autenticação de alimentos e bebidas tem aumentado significativamente com a crescente consciência do consumidor, bem como é de interesse de empresas que não desejam a competição injusta com empresários sem escrúpulos que ganham vantagens econômicas através de práticas fraudulentas observadas nas indústrias (REID et al., 2006).

A legislação brasileira especificou limites para a adição de ingredientes não cárneos com a finalidade de promover extensão, mas sua detecção e quantificação ainda se constituem um problema para a fiscalização, devido à escassez de metodologias analíticas apropriadas para determinação desses ingredientes (BELLOQUE et al., 2002).

Flint e Meech (1978) foram um dos primeiros a utilizar a microscopia quantitativa ou estereológica na quantificação da proteína texturizada de soja em sistemas modelos de carne e soja (RODRIGUES, 1986). Esta técnica, contudo apresentou problemas devido à baixa exatidão na determinação de certos tipos de produtos de soja, sendo muito demorada, resultando um elevado custo por determinação (GRIFFITH; BILLINGTON; GRIFFITHS, 1981).

A mesma técnica foi testada colaborativamente em 1980/81, não sendo considerada precisa, por isto, o método imunoenzimático ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) foi investigado como um procedimento alternativo para determinação de proteínas de soja em alimentos (CRIMES; HITCHCOCK; WOOD, 1984).

A *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) propõe a utilização do *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) para controle do emprego de soja em produtos cárneos (AOAC, 2005). A técnica consiste de um imunensaio enzimático (ELISA) semiquantitativo, podendo ser quantitativo se a natureza da soja utilizada for conhecida (método 988.10).

A determinação de proteína de soja em produtos cárneos também pode ser realizada por análise de peptídeos após hidrólise enzimática e o produto

caracterizado pelo analisador de aminoácidos. É uma técnica demorada (5 a 6 dias) que utiliza equipamento especializado, não estando disponível nos laboratórios de análise de rotina, que requerem rapidez para um grande número de amostras (BAYLEY, 1976; AGATER et al., 1986).

Diversas referências propõem o emprego de técnicas em alternativa ao ELISA, que, considerado de acuidade limitada, moroso, caro e complexo, tem sido bastante criticado (LEITNER et al., 2006).

A técnica dos Isótopos Estáveis pode ser visualizada como uma ferramenta visando à autenticidade dos alimentos, particularmente onde metodologias analíticas convencionais não podem prever resultados totalmente seguros (BAHAR et al., 2005).

O custo de uma análise isotópica é relativamente baixo, sobretudo se considerarmos que requer um número bem menor de amostras, comparativamente a outros métodos (MISI et al 2004).

2.5. Isótopos estáveis

O termo “isótopo” originou-se do grego *iso* (mesmo ou igual) e *topos* (lugar), referindo-se ao fato de que os isótopos ocupam o mesmo lugar na tabela periódica dos elementos (KELLY, 2003; QUEIROZ, 2005). A expressão “estável” significa que não emite radiação (energia ou partículas subatômicas), ou seja, não altera sua massa ao longo de sua existência (MARTINELLI et al., 2009).

Os isótopos apresentam o mesmo número de elétrons em sua camada eletrônica, portanto pode-se dizer que apresentam mesmas propriedades químicas e diferentes propriedades físicas, permitindo assim que sejam utilizados como traçadores naturais em pesquisa (BOUTTON, 1991).

Os isótopos são átomos do mesmo elemento químico, mas que diferem em número de nêutrons, apresentando diferentes massas (KENNEDY; KROUSE, 1990). O diferente número de massa dos isótopos possibilita a sua identificação e sua utilização em estudos geológicos e ambientais. Ou seja, é possível quantificar os diferentes isótopos de um mesmo elemento.

Os isótopos do Carbono (C) e Nitrogênio (N) apresentam um isótopo estável leve dominante - Carbono-12 (^{12}C) e Nitrogênio-14 (^{14}N) - e um ou dois

isótopos estáveis pesados - Carbono-13 (^{13}C) e Nitrogênio-15 (^{15}N) - com abundância ou concentração natural expressa em átomos % (DUCATTI, 2014).

Em relação à abundância natural dos isótopos estáveis de Carbono, aproximadamente 98,89 átomos % existentes correspondem ao ^{12}C e apenas 1,11% ao ^{13}C (BOUTTON, 1996; SILVA et al., 1999; ROSSMANN, 2001; COPLEN et al., 2002; KELLY, 2003; DUCATTI, 2014). No caso dos isótopos estáveis de Nitrogênio, aproximadamente 99,63 átomos % existentes correspondem ao ^{14}N e apenas 0,37 ao ^{15}N , conforme mostra a Tabela 3.

TABELA 3. Abundância natural dos isótopos estáveis dos elementos C, H, O, N e S e suas moléculas gasosas.

Isótopo leve	Átomos %	Isótopo pesado	Átomos %	Gás
^1H	99,9844	^2H	0,0156	H_2
^{12}C	98,8890	^{13}C	1,1110	CO_2
^{14}N	99,6340	^{15}N	0,3660	N_2
^{16}O	99,7628	^{16}O	0,0372	CO_2
		^{18}O	0,2000	CO_2
^{32}S	95,0180	^{33}S	0,7500	SO_2
		^{34}S	4,2150	SO_2
		^{36}S	0,0170	SO_2

Adaptado: PRESTON, 1992.

A determinação dos isótopos estáveis dos bioelementos, Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre em compostos orgânicos têm adquirido crescente importância para determinações da origem e controle da autenticidade dos gêneros alimentícios (WEBER et al., 1997).

Frequentemente, os isótopos estáveis têm sido aplicados de forma crescente e contínua em pesquisas agrícolas, ecológicas e fisiológicas

(GANNES et al., 1998) e apresentam-se como alternativa promissora para identificar a procedência e a qualidade de produtos de origem animal e vegetal.

Os estudos de discriminação de isótopos do Carbono em plantas iniciaram-se na década de 70, quando foi demonstrado e aceito que as composições isotópicas das plantas diferiam amplamente e que a relação dos isótopos estáveis do Carbono poderia ser utilizada para distinguir as plantas C_3 de C_4 (BENDER, 1971; SMITH; EPSTEIN, 1971; SMITH; BROWN, 1973).

As plantas, na sua maioria, podem ser classificadas em dois grupos principais, de acordo com a via fotossintética de fixação do CO_2 : ciclo fotossintético C_3 e ciclo fotossintético C_4 . Nas rotas bioquímicas destes ciclos, o primeiro composto orgânico sintetizado pode conter três ou quatro átomos de Carbono. As plantas que possuem ciclo bioquímico, onde o primeiro composto orgânico sintetizado possui três átomos de Carbono, são denominadas de planta do ciclo fotossintético C_3 ; pertencem a este grupo cerca de 85% das espécies vegetais (grande parte das dicotiledôneas). Por outro lado, as plantas em que o primeiro composto orgânico formado possui quatro átomos de Carbono são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C_4 ; neste grupo estão algumas dicotiledôneas (Tabela 4) e grande parte das monocotiledôneas (gramíneas, milho, arroz, etc.) (DUCATTI, 2014).

TABELA 4. Exemplos de plantas do Ciclo Fotossintético C₃ e C₄.

<i>Plantas C₃</i>	<i>Plantas C₄</i>
<i>Dicotiledôneas</i>	<i>Monocotiledôneas</i>
Arroz, leguminosas, trigo, cevada, frutas, hortaliças, beterraba, mandioca, algodão, alfafa, soja, feijão, trevo branco, linhaça.	Milho, cana-de-açúcar, milheto, sorgo, forrageiras, gramíneas tropicais
Nitrogênio-15	Carbono-13
<i>Leguminosas</i>	<i>Não leguminosas</i>
Feijão, soja	Várias

Fonte: DUCATTI, 2014.

Durante a assimilação fotossintética, as plantas do ciclo fotossintético C₃ fixam o CO₂ atmosférico através do ciclo Calvin-Benson e apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -22 e -34‰ (valor modal = -26,7‰). O CO₂ atmosférico, o qual possui valor de $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -7,7‰ (KENNEDY; KROUSE, 1990), é a fonte primária de Carbono para as plantas terrestres. As plantas do ciclo fotossintético C₄ fixam o CO₂ atmosférico através do ciclo Hatch-Slack e apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -9 e -16‰ (valor modal = -12,6‰). O sinal negativo indica que a planta ou seu subproduto apresentam menor concentração de ¹³C que o padrão internacional. Portanto, as plantas C₃ e C₄ possuem assinaturas isotópicas diferentes, devido ao fracionamento que ocorre durante a fixação fotossintética do Carbono (SMITH; EPSTEIN, 1971; O'LEARY, 1981; KENNEDY; KROUSE, 1990; VOGEL, 1993).

Considerando-se a existência da diferença isotópica da ordem de 14‰ mais rico em ¹³C nas plantas do ciclo fotossintético C₄, em relação às do ciclo fotossintético C₃, torna-se possível a utilização destas plantas e seus subprodutos como marcadores em animais, sem a necessidade de sintetizar compostos especificamente marcados (DUCATTI, 2007).

A diferença entre os sinais isotópicos das plantas do ciclo C_3 e ciclo C_4 e seus subprodutos pode caracterizar a adulteração do produto ou o controle de qualidade do mesmo (KRUEGER, 1995; LICATTI, 1997).

De acordo com Oliveira et al. (2002), o uso da razão isotópica do Carbono ($^{13}C/^{12}C$), tem sido largamente empregado no controle e inspeção de alimentos e bebidas. A metodologia isotópica é especialmente útil quando a composição de bebidas e alimentos baseia-se em misturas de compostos produzidos a partir de plantas de metabolismo fotossintético C_3 e C_4 , pois existe uma grande diferença entre a composição isotópica destes dois tipos de plantas.

Assim, plantas C_3 e C_4 apresentam valores de $\delta^{13}C$ suficientemente distintos de forma a não sofrer sobreposição, o que favorece a utilização do método de isótopos estáveis para distinguí-las como fontes diferenciadas (BOUTTON, 1991; FARQUHAR et al., 1989; KEELEY; SANDQUIST, 1992; LAJTHA; MARSHALL, 1994; O'LEARY, 1988).

Diferentemente do Carbono, a razão isotópica $^{15}N/^{14}N$ nas plantas não depende do ciclo fotossintético realizado. Quando o Nitrogênio é absorvido do ar atmosférico pelas bactérias fixadoras ou pelo uso de fertilizantes industriais, o valor do $\delta^{15}N$ no solo é baixo, em torno de 0‰. Se absorvido da matéria orgânica decomposta, o valor do $\delta^{15}N$ é mais significativo, ao redor de 5‰ (DUCATTI, 2014).

No caso das leguminosas que utilizam o ar atmosférico como fonte para fixação de Nitrogênio, esta razão aproxima-se do padrão internacional, e no caso das gramíneas, dependentes do solo como fonte de Nitrogênio, esta razão varia em função de cada solo específico, dependente de inúmeros fatores como clima e adubação (DUCATTI, 2014).

A incorporação do Nitrogênio à planta se dá por diferentes processos, que variam de acordo com a espécie cultivar, presença de micro-organismos fixadores de Nitrogênio, ambiente e forma de nutrientes (HAYNES, 1986).

Por exemplo, o solo contém mais ^{15}N que a atmosfera, assim, plantas que fixam o Nitrogênio atmosférico são empobrecidas quanto a esse elemento, em relação às não-fixadoras para um mesmo local (GANNES et al., 1998).

Valores negativos de $\delta^{15}N$ são observados em solos com baixa porcentagem de matéria orgânica, em particular solos secos e arenosos.

Quando for adicionado esterco como fertilizante natural, a taxa de fracionamento é alta, com valores de $\delta^{15}\text{N}$ em torno de 10‰ (SHIBUYA et al., 2006).

Os isótopos estáveis começaram a ser utilizados como traçadores ambientais com o aprimoramento do espectrômetro de massa na década de 30, mas somente na década de 40 que Norman e Werkman (1943) se tornaram os pioneiros na utilização do ^{15}N no estudo de absorção de Nitrogênio por soja.

A utilização das razões isotópicas em estudos ambientais baseia-se na existência de diferenças na composição isotópica dos compostos que participam do processo em estudo, sensíveis o suficiente para serem detectados pelo espectrômetro de massa. Tais diferenças ocorrem na natureza e são frutos de reações físico-químicas e/ou biológicas, possibilitando, deste modo, a discriminação de um dos isótopos (MARTINELLI et al., 1988).

As variações da razão de isótopos estáveis de Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) são medidas com alta precisão através de espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS). A espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) é uma técnica que permite distinguir compostos quimicamente idênticos, através da análise de seu conteúdo em isótopos (BRENNAN et al., 1997).

Os resultados obtidos podem ser expressos em átomos % (amostras enriquecidas) com desvio-padrão na ordem de 0,1% ou em termos de enriquecimento isotópico relativo, expresso em delta per mil ($\delta\text{‰}$) (amostras com abundâncias isotópicas naturais), com desvio-padrão na ordem de 0,2‰ ou menos (ROSSMANN, 2001; DUCATTI, 2014).

Para assegurar a eficiência dessa técnica, todas as amostras devem ser convertidas em gases simples, como por exemplo, Hidrogênio, Dióxido de carbono, Monóxido de carbono, Nitrogênio, Oxigênio ou Enxofre (FORSTEL, 2007). A razão entre os isótopos estáveis, mensurados por espectrometria de massa de baixa resolução, com leitura em delta (δ) é obtida pela expressão:

$$\delta \text{ (amostra, padrão)} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3$$

Onde:

δ = enriquecimento do isótopo mais pesado do elemento químico X (C ou N) da amostra em relação ao respectivo padrão internacional. Adimensional.

R = representa a razão isotópica entre o isótopo menos e o mais abundante, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Adimensional.

Uma vez que os valores numéricos das diferenças são pequenos, costuma-se multiplicar e dividir a expressão por 1000, obtendo-se a terminologia em delta per mil ($\delta\text{‰}$) (KELLY, 2003).

Resultados positivos indicam que a amostra é mais pesada que o referido padrão, ou seja, ela apresenta mais isótopo pesado, enquanto que resultados negativos indicam que a amostra é mais leve, com menos isótopo pesado (DUCATTI, 2004), como mostra a Figura 1.

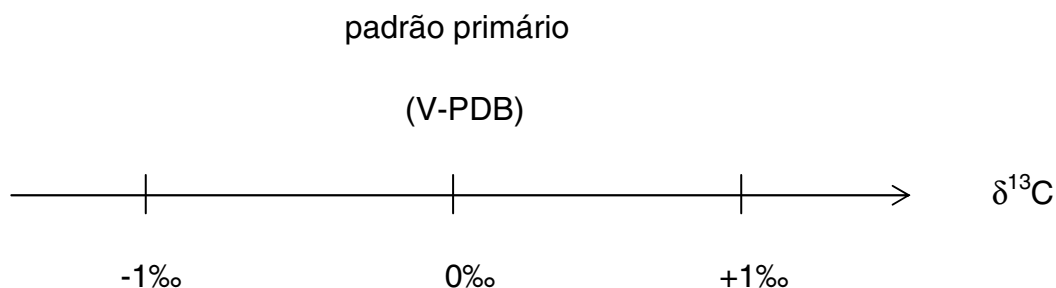


FIGURA 1. Interpretação figurativa da régua isotópica com escala de $\delta\text{‰}$ (DUCATTI, 2014).

Para os isótopos estáveis do Nitrogênio, o padrão internacional aceito é o Nitrogênio do ar atmosférico, o qual é considerado uma mistura isotópica homogênea na superfície terrestre. Para os isótopos estáveis do Carbono, o padrão é o *Cretaceous carbonate*, trata-se de um fóssil carbonatado sólido da era Cretáceos, da formação *Peedee* da Carolina do Sul, Estados Unidos, o qual foi empregado inicialmente como padrão por Craig (1957). Segundo Friedman e O'Neill (1997), o padrão PDB (*Peedee Belemnite*) é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas de carbono, o qual está representados na Tabela 5.

TABELA 5. Razão isotópica absoluta dos padrões internacionais.

Razões isotópicas absolutas	Padrão Internacional
$^2\text{H}/^1\text{H} = 0,00015576$ $^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = 0,00200520$ $^{17}\text{O}/^{16}\text{O} = 0,00037300$	<i>Vienna standard mean ocean water</i> (V-SMOW)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0,01123720$ $^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = 0,00206710$ $^{17}\text{O}/^{16}\text{O} = 0,00037900$	<i>Vienna Peedee Belemnite</i> (V-PDB)
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 0,00367650$	Nitrogênio Atmosférico (N ₂ atm)
$^{34}\text{S}/^{32}\text{S} = 0,04500450$ $^{33}\text{S}/^{32}\text{S} = 0,00810000$	<i>Vienna Cañon Diable Mevalorite Troilite</i> (V-CDT)

Fonte: BARRIE; PROSSER, 1996.

Os padrões internacionais são escassos ou raros, uma vez que o padrão PDB vem desaparecendo ao longo do tempo. Portanto, foi substituído por sub-padrões internacionais. Esses padrões são muitas vezes de alto custo para o uso nas análises diárias, assim muitos laboratórios utilizam seu “padrão interno de trabalho” (UNKOVICH et al., 2001).

Na prática, as amostras são analisadas contra uma referência de laboratório, comumente designada como padrão de trabalho, o qual deve ser calibrado previamente contra os sub-padrões internacionais, através de comparações interlaboratoriais (DUCATTI, 2014). A mensuração dos isótopos ambientais vem crescendo, conforme se aprimora a rotina de laboratórios e equipamentos (CLARK; FRITZ, 1997).

A análise de isótopos estáveis foi, durante muito tempo, utilizada principalmente por geólogos e geoquímicos, mas nos últimos 20 anos tem aumentado significativamente a aplicação desta tecnologia na avaliação da legalidade dos alimentos (THOMAS et al., 2005).

A técnica de isótopos estáveis é utilizada para auxiliar na diferenciação de produção, certificação de origem e controle de fraudes de produtos de origem animal (ROSSMANN, 2001). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ estão relacionados aos hábitos alimentares, legalidades dos rótulos de produtos industriais, rastreabilidade de produtos e origem geográfica (THOMAS et al., 2005).

Os valores de isótopos estáveis na matéria-prima são muito semelhantes aos respectivos valores do produto industrializado, sendo possível detectar adulteração fraudulenta em vários alimentos de origem animal e vegetal. A espectrometria de massas, por meio da análise da razão isotópica do $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ vem sendo utilizada com sucesso para testar a autenticidade e a qualidade de produtos, tais como o leite (RENOU et al., 2004; BRESCIA et al, 2005; RITZ et al, 2005), queijo (MANCA et al, 2001; CAMIN et al, 2004; BRESCIA et al, 2005), carne (BONER; FORSTEL, 2004; BAHAR et al, 2008), peixe (FOCKEN, 2004; TRUEMAN; GAYE-SIESSEGGGER et al, 2004; MCGILL; GUYARD, 2005), méis, xaropes, vinagres, etanol, destilados, cervejas, conhaques, óleos, compostos aromáticos, aditivos, entre outros (WINKLER; SCHMIDT, 1980).

Os valores das razões isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ permitem usar essa metodologia para avaliar a presença de proteína de soja nos hambúrgueres de carne bovina oferecidos ao consumidor. No entanto, não há referências em literatura na utilização da técnica de isótopos estáveis no estudo desses produtos, especialmente em investigações de adulterações por excesso de proteína de soja em marcas comerciais brasileiras.

O problema de detecção de adulteração em alimentos é um enorme desafio para a indústria. Assim como produtos fraudulentos possuem sofisticadas formulações de imitações, as metodologias atuais de detecção se tornaram obsoletas. Com isso, vem se desenvolvendo uma nova análise tecnológica em metodologia de análise de razão isotópica de alta precisão para detecção de fraudes (KRUEGER, 1995).

A técnica dos isótopos estáveis tem sido utilizada, rotineiramente, no controle de qualidade dos processos industriais de produção de bebidas e nas instituições oficiais de fiscalização como instrumento de autuação de produtos fraudados (KELLY, 2003).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento oficializou a análise da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em produtos e subprodutos das plantas do ciclo fotossintético C_3 e C_4 através da Instrução Normativa nº 4, de 05 de fevereiro de 2001 (BRASIL, 2001b).

A autenticação definitiva e efetiva de produtos alimentícios requer o uso de técnicas analíticas constantemente atualizadas, pois os perpetradores das fraudes empregam métodos de adulteração e falsificação que são cada vez mais difíceis de descobrir (REID et al., 2006).

O desenvolvimento de novas tecnologias cada vez mais sofisticadas ou de novos métodos para a determinação de autenticidade de produtos alimentares continua em passo acelerado, com uma consciência cada vez maior por parte dos consumidores em relação à segurança alimentar e ao problema da autenticidade. A aplicação dos métodos de análise de isótopos tornou-se uma arma crucial no combate à fraude por adulteração (FERREIRA, 2008).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

- a) Avaliar a qualidade higiênico-sanitária de hambúrgueres bovinos de marcas comerciais brasileiras.
- b) Avaliar a qualidade do produto, especialmente em relação a sua composição declarada nas embalagens, referente à presença ou não de proteína de soja, procurando detectar aquelas que lesam o consumidor quanto à idoneidade de suas informações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Como testes preliminares foram analisados os ingredientes (emulsificante 502, estabilizante a base de polifosfato, mistura de dextrina com antioxidante e aroma de picanha) mais comumente adicionados à formulação dos hambúrgueres. Os resultados obtidos dos deltas de Carbono e Nitrogênio

indicaram que estes ingredientes não interferem no $\delta^{13}\text{C}$ e no $\delta^{15}\text{N}$ da proteína de soja adicionada nos hambúrgueres de carne bovina.

Para confirmar que a marca controle 100% carne era composta somente por carne bovina e sem adição de proteína de soja, analisou-se amostras de cortes filé *mignon* e fraldinha, cujos valores dos $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ se aproximaram dos deltas das amostras controle 100% carne (L) (Tabela 6). Da mesma forma, quando comparados, os deltas da soja foram semelhantes aos deltas das amostras controle 100% soja (M).

TABELA 6. Valores dos $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ da soja, dos cortes filé *mignon* e fraldinha e das amostras controle 100% carne e 100% soja

AMOSTRA	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
filé <i>mignon</i>	-13,28	5,78
fraldinha	-12,99	7,13
soja	-25,07	1,96
amostras controle 100% carne	-12,99	5,84
amostras controle 100% soja	-26,02	-0,54

Para avaliar a qualidade higiênico-sanitária e o perfil isotópico dos hambúrgueres de carne bovina, foram analisadas 11 marcas comerciais brasileiras, nominadas como marcas fictícias A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e L. As amostras da marca L foram as controle 100% carne e as amostras da marca M foram as controle 100 % soja. Estas últimas não foram analisadas pela metodologia microbiológica.

Todas as empresas fabricantes possuem Serviço de Inspeção Federal – SIF e situam-se nos estados do sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (SP, MS, PR, MT, SC). Os lotes foram produzidos nas datas entre o segundo semestre de 2012 e primeiro semestre de 2013 (Tabela 7).

TABELA 7. Marcas, local de produção, data de fabricação e nº de lotes das 11 marcas comerciais de hambúrgueres bovinos analisados.

Marca	Local de produção	Data de fabricação	Nº de lotes
A	São Gabriel do Oeste –MS	26/11/12	1
B	Itapira -SP	05/03/13 09/03/13	2
C	Campo Grande-MS	08/11/12	1
D	Medianeira –PR	12/12/12 22/01/13	2
E	Jaú-SP	15/12/13	1
F	Bauru-SP	26/12/12	1
G	Várzea Grande- MT	31/10/12 22/12/12	2
H	Várzea Grande –MT	19/12/12	1
I	Salto Veloso-SC	17/12/12	1
J	Campo Grande-MS	10/12/12	1
L	São Paulo-SP	13/10/12	1

As amostras foram coletadas em supermercados do estado de São Paulo e encaminhadas sob-refrigeração para o Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da UNESP/Botucatu para a realização das análises microbiológicas e para o Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu para avaliação do perfil isotópico dos hambúrgueres de carne bovina.

As análises microbiológica e isotópica foram realizadas com 10 repetições de cada marca, totalizando em 110 amostras analisadas.

4.1. Análises microbiológicas

Todas as análises microbiológicas foram realizadas segundo a metodologia descrita pela Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

4.1.1. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foram pesados assepticamente 25g de cada amostra de hambúrguer em sacos plásticos estéreis, aos quais foram adicionadas de 225 mL de água peptonada tamponada (APT) estéril 1% e homogeneizadas em *stomacher* por 2 minutos. Posteriormente, foram incubadas a 35°C por 18-24 horas. Então, foram transferidos 0,1 e 1 mL do líquido da mistura pré-enriquecida para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetracionato Muller-Kauffmann (TT) respectivamente, sendo a incubação de ambos realizada a 42°C (RV) e 35°C (TT) por 18-24 horas. Os caldos de enriquecimento seletivo foram estriados, com alça de níquel-cromo, na superfície de placas contendo agar Sulfito Bismuto (BS) e agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD), com incubação a 35°C por 18-24 horas. As colônias características de *Salmonella* sp. foram repicadas para os agars (Triple Sugar Iron (TSI) e Lisina Iron Agar (LIA), sendo os mesmos incubados a 35°C por 18-24 horas. As colônias com resultados presumivelmente positivos para *Salmonella* sp., em pelo menos um dos agars (TSI ou LIA) foram submetidas ao teste de soroaglutinação.

Após a confirmação sorológica, as colônias foram semeadas em tubos contendo agar nutriente e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foram enviadas ao Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, no Rio de Janeiro/RJ, para tipificação.

4.1.2. Contagem de Coliformes a 45°C

Para pesquisa de coliformes termotolerantes foram preparadas três diluições decimais, sendo repicado de cada uma delas, um volume de 1 mL em placas com Agar Bile Vermelho Violeta (VRBA) previamente fundido e mantido a 46-48°C em banho-maria. Após a solidificação do meio, foram adicionados sobre cada placa mais 15 mL de VRBA, formando uma segunda camada de meio. As placas foram incubadas a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, para posterior

realização da contagem das colônias típicas e atípicas. Para confirmação dos coliformes termotolerantes foram selecionadas colônias típicas, ou seja, róseas, com 0,5 a 2 mm de diâmetro, rodeado ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio, repicadas para tubos contendo caldo EC e incubadas a $45^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas em banho-maria sob agitação. As culturas que apresentaram formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham), ou efervescência quando agitadas suavemente, foram consideradas positivas para coliformes termotolerantes de acordo com a metodologia oficial.

4.1.3. Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Foi utilizado o agar Baird Parker adicionado de emulsão de gema de ovo e solução de telurito de potássio 1%, sendo a semeadura feita em superfície a partir de 0,1 mL de cada uma das diluições. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem, selecionando-se aquelas que apresentarem de 20 a 200 colônias típicas de *Staphylococcus*, ou seja, negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio. A seguir, cinco colônias típicas foram repicadas para tubos contendo Brain Heart Infusion (BHI), os quais foram incubados a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Posteriormente, foram transferidos 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho. Estes foram incubados a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 horas. Para confirmação, foi verificada a presença ou não de coágulos. A formação de coágulos é interpretada como uma prova positiva.

4.1.4. Contagem de *Clostridium* sulfito redutor a 46°C

Foi empregado o Ágar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) fundido e resfriado a $40-45^{\circ}\text{C}$. A cada uma das placas foi adicionado então 1 mL de cada

amostra nas diluições de 10^{-1} a 10^{-3} e a seguir, cerca de 15 mL do agar. As placas foram movimentadas suavemente para uma boa homogeneização da mistura. Depois da solidificação, foi adicionado a cada placa um volume adicional de 10 mL do mesmo meio de cultura, sendo a incubação realizada a 46°C por 24 horas sob anaerobiose, em jarra “Gas Pak®”. Após a incubação as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC/g de amostra.

4.2. Análises isotópicas

A análise dos isótopos estáveis foi realizada com o intuito de avaliar a legalidade da composição dos hambúrgueres de carne bovina em relação à porcentagem de proteínas não cárnicas (especialmente a proteína de soja), declaradas ou não nos rótulos de 10 marcas comerciais brasileiras.

4.2.1. Metodologia isotópica

Para realizar as análises isotópicas dos hambúrgueres, 25g das amostras foram descongelados e secos em estufa de ventilação forçada a 56°C por um período de 48 horas.

Após esse período, as amostras foram acondicionadas em papel-filtro devidamente identificadas para extração da gordura. Por meio do aparelho de Soxhlet, as amostras foram imersas em éter etílico (PA) e mantidas sob temperatura de aproximadamente $55-65^{\circ}\text{C}$ por 4 horas. Posteriormente, foram suspensas durante uma hora para gotejamento do éter recondicionado e secas em estufa de ventilação forçada para evaporação do éter por mais uma hora.

A extração de lipídeos foi realizada nos hambúrgueres devido à grande quantidade de gordura presente nas amostras. Segundo Tieszen et al (1983), as frações que possuem um alto valor de lipídeos são relativamente pobres em Carbono-13, quando comparadas às frações que possuem pouca quantidade de gordura.

Na etapa seguinte, as amostras foram moídas em moinho criogênico de nitrogênio líquido, a -196°C por 3 minutos, em frequência máxima, para a

obtenção de um material homogêneo e de finíssima granulometria (partículas $<60\ \mu\text{m}$), com aspecto microscópico (ROSA et al., 2002).

Em seguida, os hambúrgueres moídos e desengordurados foram pesados em balanças de alta precisão, de 50 a 60 μg para Carbono e 500-600 μg para Nitrogênio, em cápsulas de estanho, para definição das razões isotópicas de Carbono e Nitrogênio.

Logo após a pesagem, as amostras foram encaminhadas para o espectrômetro de massa DELTA-S acoplado ao Analisador Elementar para a determinação da composição isotópica dos produtos. As amostras foram transformadas em sua forma gasosa a fim de realizar as leituras, assim como o padrão de referência.

A forma gasosa mais comumente utilizada para a análise do Carbono é o CO_2 , e para Nitrogênio é o N_2 (DUCATTI, 2014). No espectrômetro (Figura 2), as moléculas gasosas são ionizadas e posteriormente, esses íons são separados em um espectro de acordo com a razão massa/carga (m/z), usando campos magnéticos e elétricos (BARRIE; PROSSER, 1996).

Já no sistema de detecção, os feixes iônicos característicos de cada feixe isotópico são coletados em copos de *Faraday*. As neutralizações destes íons resultam em correntes elétricas, as quais são amplificadas e registradas, onde finalmente ocorre a aquisição dos dados no computador (BOUTTON, 1996; PORTO, 2006; DUCATTI, 2007).

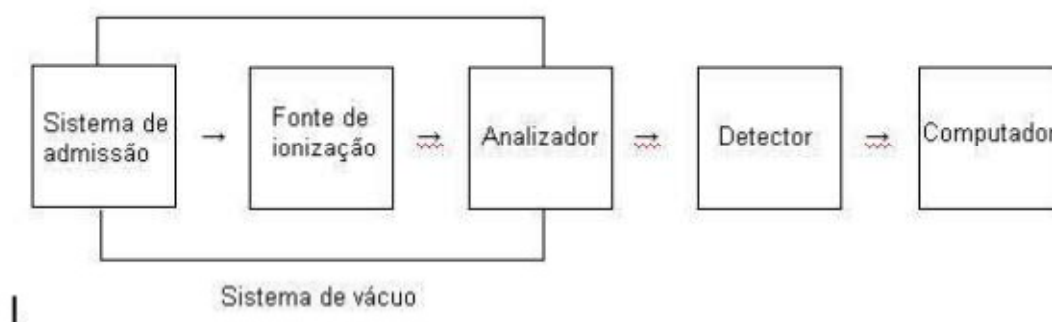


FIGURA 2. Diagrama esquemático dos componentes do espectrômetro de massas (DUCATTI, 2014).

Os resultados são expressos em notação $\delta^{13}\text{C}$, em relação ao padrão *Peedee Belemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰ e na notação

$\delta^{15}\text{N}$, em relação ao padrão N_2 atmosférico com erro de ordem de 0,3‰, calculado pela equação:

$$\delta i \text{ (amostra, padrão)} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3$$

A simbologia da expressão indica que (R) representa a razão entre o isótopo menos abundante e o mais abundante, em particular $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e (*i*) refere-se ao isótopo pesado do elemento químico em consideração. A terminologia δ (amostra, padrão) reflete o enriquecimento da razão isotópica do elemento químico em questão, de uma dada amostra em relação ao seu respectivo padrão internacional, em partes per mil (‰).

Os resultados isotópicos obtidos foram submetidos à análise multivariada de variância (MANOVA) com o auxílio do procedimento GLM do programa estatístico SAS (1996) e compilados em reta isotópica padrão, com auxílio do programa Origin 6.0 Professional (Microcal Software Original 6.0 Professional, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises microbiológicas

Todas as 11 marcas comerciais brasileiras apresentaram contagem bacteriana dentro do limite aceitável (5×10^3 UFC/g) prescrito pela RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 para Coliformes a 45°C. A baixa contagem de coliformes termotolerantes destes alimentos pode ser considerada uma informação relevante à manutenção correta de refrigeração e de boas práticas de higiene e sanitização requeridas para o processamento e armazenamento dos hambúrgueres analisados.

A pesquisa de coliformes termotolerantes nos alimentos fornece com maior segurança informações sobre as condições sanitárias do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (APHA, 2001).

A remoção ou a diminuição do número de bactérias coliformes pode ser evidenciada após o tratamento da carne utilizada na fabricação de hambúrgueres por pasteurização com água a 85°C por 45 ou 60 segundos (GILL et al., 2001).

Contudo, os valores para *Staphylococcus* coagulase positiva estavam acima dos padrões permitidos na marca H (amostras 1 e 7), ou seja ultrapassaram o valor de 5×10^3 UFC/g estabelecido pela legislação vigente. A partir destes resultados, levanta-se a hipótese de que possivelmente ocorreram temperaturas de armazenamento inadequadas ou condições higiênicas insatisfatórias dos equipamentos, superfícies de contato e até mesmo, dos manipuladores durante a fabricação destes alimentos.

Segundo Silva Junior (1991), *Staphylococcus* são normalmente provenientes de mãos, secreção nasal e orofaringe. Apesar dos manipuladores de alimentos serem, normalmente, as principais fontes de contaminação dos alimentos, os equipamentos e as superfícies podem da mesma forma, ser a fonte das contaminações por estes patógenos.

A presença de números elevados de *Staphylococcus* coagulase positiva é uma indicação de perigo potencial à saúde pública, devido à enterotoxina estafilocócica, bem como à sanitização questionável (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

Os alimentos assim contaminados e que não forem cozidos ou refrigerados adequadamente, permanecendo em temperatura ambiente por determinado tempo, poderão causar intoxicação por este grupo de micro-organismos (BLACK, 2002).

As marcas B (amostra 5), D (amostra 5), E (amostra 5) e G (amostra 4) também apresentaram contagens acima do estipulado (3×10^3 UFC/g) para *Clostridium* sulfito redutor a 46°C, logo não estão adequadas para o consumo do ponto de vista higiênico-sanitário. Estes resultados podem ser indicadores de contaminação hídrica e temperaturas de refrigeração inadequadas, devido à capacidade esporogênica e resistência dos esporos deste grupo de micro-organismos, entre eles *Clostridium perfringens*.

A importância do *Clostridium perfringens*, apesar da frequência moderada na água como *habitat* natural, deve-se, principalmente, a sua maior

resistência às substâncias tóxicas, que lhe confere maior sobrevivência em águas poluídas e ambientes inóspitos (ROITMAN et al., 1987).

Clostridium perfringens pode crescer em intervalos de temperatura compreendidos entre os 15°C e os 50°C. A conservação dos alimentos a temperaturas de refrigeração é suficiente para inibir o crescimento desta espécie causadora de infecções alimentares (PINTO, 1996).

Para *Salmonella* spp., o padrão microbiológico preconizado pela resolução 12 da ANVISA é ausência em 25g de amostra, o qual confronta com resultado obtido na marca controle de carne L (amostra 6). A sorotipagem revelou uma cepa positiva para *Salmonella*, sendo seu sorovar classificado como S. Infantis no hambúrguer bovino.

A infecção por *Salmonella enterica*, veiculada por alimentos, continua sendo uma preocupação atual na maioria dos países. Apesar de haver surtos associados ao consumo dos mais variados alimentos, sem dúvida os produtos de origem animal têm um papel de destaque como via de transmissão para o consumidor (CARDOSO, 2006).

A espécie *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies, onde aproximadamente 99.5% dos sorovares mais comumente isolados pertencem à subespécie *enterica* (FERREIRA; CAMPOS, 2008). Há uma preocupação crescente sobre as infecções humanas causadas por sorovares como Infantis, Agona, Hadar, Heidelberg e Virchow (FREITAS NETO et al., 2010).

Na União Europeia, *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Hadar e Virchow são consideradas pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar os sorovares mais importantes em termos de saúde pública (EFSA, 2012).

Dargatz et al. (2000) ao analisarem fezes de gado confinado, relataram uma maior prevalência de sorotipos do Grupo C1 (33,3%), como S. Mbandaka, S. Montevideo e S. Infantis. Segundo os autores, é possível que esse sorogrupo esteja tornando-se melhor adaptado à espécie bovina ou que suas fontes de contaminação se apresentem em maior frequência nos sistemas de confinamento.

Beach et al. (2002) trabalhando com rebanhos confinados e rebanhos criados de forma extensiva, ambos aparentemente sadios, encontraram esses mesmos sorotipos contaminando fezes, couro bovino, alimentos e o ambiente de criação dos animais. Esses dados reforçam a preocupação expressa por

Fedorka-Cray et al. (1998) já que demonstram a possibilidade de uma estreita relação entre o consumo de carne bovina e a contaminação por *Salmonella* spp. no homem.

As salmonelas têm sido extensamente relatadas em bovinos, os quais podem carrear este micro-organismo não detectado para dentro dos frigoríficos. Sua presença em bovinos no abate e a consequente contaminação cruzada da carcaça apresenta um significativo perigo de segurança alimentar (MCEVOY et al., 2003).

As infecções são raramente adquiridas diretamente através de carnes cruas. Na maioria dos surtos, a carne foi mal cozida ou contaminada após o cozimento pelas mãos de manipuladores de alimentos e pela adição de ingredientes contaminados (VARNAM, 1991; ICMSF, 1998).

Deve-se alertar a população sobre os cuidados ao consumir alimentos não totalmente cozidos. É importante salientar que para haver destruição de bactérias, a porção interna do hambúrguer deve ter espessura fina (63% de carne) e atingir 68,3°C sobre a chapa a 137°C (JUNEJA et al., 1997).

5.2. Análises isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

Os dados médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e seus desvios-padrões dos hambúrgueres das 10 marcas comerciais brasileiras analisadas e as amostras controle de carne (L) e soja (M) estão representados na Tabela 8. Pode-se verificar pela análise de variância multivariada (MANOVA) que os valores isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) apresentam diferença entre as marcas analisadas ($p < 0,01$).

TABELA 8. Dados médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e seus desvios-padrão das marcas comerciais dos hambúrgueres.

MARCA	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$	
	M	DP	M	DP
(A)	-18,17	0,85	2,94	0,24
(B)	-19,98	0,52	1,87	0,14
(C)	-19,40	0,48	2,21	0,28
(D)	-19,70	0,36	1,68	0,23
(E)	-17,12	0,73	4,10	0,22
(F)	-15,85	0,35	4,45	0,08
(G)	-13,34	0,38	4,75	0,53
(H)	-15,73	0,34	3,27	0,25
(I)	-18,78	0,43	3,20	0,19
(J)	-18,91	0,88	3,02	0,36
CARNE (L)	-12,99	0,32	5,84	0,47
SOJA (M)	-26,02	1,24	-0,54	0,80

A à J = marcas comerciais brasileiras de hambúrgueres de carne bovina;

L = amostras controle 100% carne; M = amostras controle 100% soja;

$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ = enriquecimento isotópico relativo para Carbono-13 e Nitrogênio-15; M = média; DP = desvio- padrão

As amostras controle de carne (L) apresentaram o valor médio de -12,99‰ para $\delta^{13}\text{C}$, característico dos tecidos das plantas C_4 (-12‰) (Figura 3), como gramíneas tropicais e forrageiras, as quais geralmente são destinadas à alimentação dos bovinos (matéria-prima dos hambúrgueres analisados) integrantes da cadeia produtiva de carne no Brasil.



FIGURA 3. Régua isotópica com escala de $\delta^{13}\text{C}$: amostra em relação ao padrão internacional (DUCATTI, 2014).

O alto valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ (5,84‰) das amostras da marca L fundamenta-se pelo fato de que os bovinos estão próximos ao topo da cadeia alimentar (Figura 4). Quando as cadeias alimentares são examinadas, os diferentes processos de C e N destacam-se mais claramente. Os valores isotópicos de Nitrogênio aumentam de 10 a 15‰ em muitas cadeias alimentares. Esse aumento é devido à presença de 3 à 5 sucessivas transferências tróficas, cada uma aumentando a concentração de ^{15}N de 3 a 5‰ (MINAGAWA; WADA, 1984).

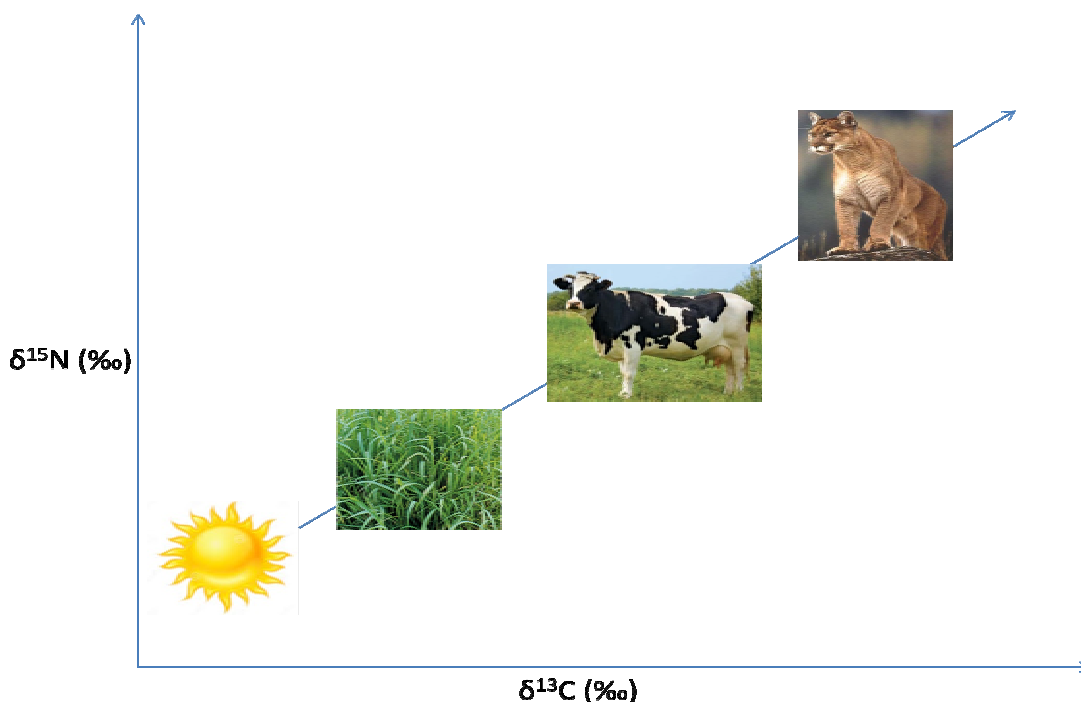


FIGURA 4. Variação de valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ conforme a posição ocupada na cadeia alimentar (Adaptado: BEMIS; KENDALL, 2004).

A composição isotópica de Nitrogênio pode identificar as relações tróficas entre os organismos (níveis tróficos) e, por conseguinte, a estrutura da cadeia alimentar (MINAGAWA; WADA, 1984).

Foram utilizados dois isótopos, pois como metodologia inédita, não há conhecimento prévio sobre qual dos isótopos (Carbono ou Nitrogênio) é o mais importante na análise da mistura composta de proteínas animal (carne) e vegetal (soja), uma vez que as amostras foram desengorduradas.

O uso combinado de isótopos estáveis de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e Nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), têm se revelado como eficiente ferramenta, considerando que, os organismos das teias alimentares refletem o $\delta^{13}\text{C}$ de suas fontes de energia, com diferenças variando de 0,2 a 1‰ por nível trófico (FRY, 1988), enquanto que, o incremento em $\delta^{15}\text{N}$ é de cerca de 3,4‰ (VANDER ZANDEN et al., 1997).

Em contraste aos valores das amostras controle de carne (L), as amostras controles de soja (M) apresentaram o valor médio de -26,02‰ para $\delta^{13}\text{C}$ e de -0,54‰ para $\delta^{15}\text{N}$, peculiares aos valores das plantas do ciclo fotossintético C_3 (soja) e de plantas fixadoras de nitrogênio (leguminosas).

Na maioria das leguminosas, por realizar simbiose com micorrizas, o $\delta^{15}\text{N}$ varia ao redor de uma unidade, próximo ao valor do padrão ($\delta^{15}\text{N} = 0,0 \pm 1,0\text{‰}$) (HANDLEY; RAVEN, 1992; WERNER; SCHIMIDT, 2002). Valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ são observados em solos secos e arenosos, que possuem baixa proporção de matéria orgânica.

5.2.1. Determinação da área de legalidade e avaliação das amostras

O limite de legalidade estipulado por esse modelo fornece a concentração máxima (4%) de fonte C_3 (soja) que um hambúrguer deve ter para ser considerado legal diante da legislação brasileira (BRASIL, 2000).

No Brasil, o Código de Defesa do Consumidor declara em seu art. 31 que “a apresentação de produtos deve assegurar informações corretas e claras sobre suas características, qualidades, composição e origem” (BRASIL, 2001a).

Para poder reclamar, o cidadão precisa ter conhecimento dos componentes do alimento. O rótulo deve, hoje, por lei, trazer todas as informações de composição do produto (ESQUIVEL, 2009).

Para facilitar a avaliação da legalidade e assegurar que os direitos do consumidor com relação à rotulagem dos hambúrgueres bovinos sejam cumpridos, criou-se uma área de aceite e rejeição da hipótese da adição de 4% de proteína de soja.

Conforme Figura 5, admitiu-se uma área de incerteza de 5% com relação à média obtida experimentalmente para os isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, possibilitando assim verificar se os produtos encontram-se dentro da legislação em vigor.

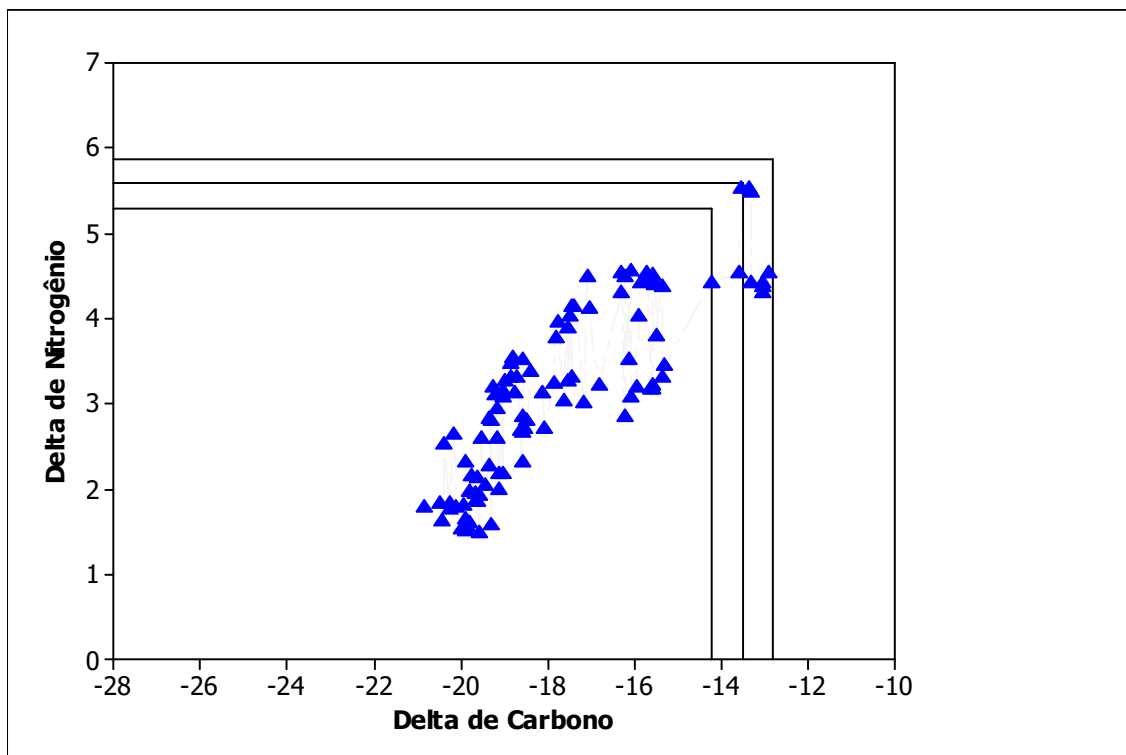


FIGURA 5. Áreas de aceite, rejeição e incerteza da adição de 4% de proteína de soja em hambúrgueres.

O limite de legalidade foi obtido pela mensuração teórica da quantidade de fonte C_3 e C_4 , baseado no princípio da diluição isotópica. Quando duas fontes, que diferem isotopicamente entre si, são misturadas uniformemente, a composição do produto gerado reflete a contribuição isotópica destas duas fontes, assim como, a quantidade de cada uma delas. Este é o princípio básico da diluição isotópica.

O princípio básico do método de diluição isotópica baseia-se na mistura de duas fontes isotopicamente diferentes entre si, gerando um produto cuja composição reflete a contribuição isotópica destas duas fontes, assim como a quantidade relativa de cada uma delas (OLIVEIRA et al., 2002).

O modelo de diluição isotópica só é válido para duas fontes e um produto quando se utiliza isótopos estáveis de um único elemento químico, como por exemplo, o ^{15}N ou ^{13}C , expresso na terminologia delta per mil ou em unidades de átomos %.

Dependendo da complexidade da formação do produto, pode-se utilizar um sistema de equações (1 e 2) com duas fontes (F_1 e F_2) e dois isótopos, propostos por Philips (2001), como foi utilizado neste trabalho. Quando duas

fontes participam da composição de um produto qualquer, a contribuição relativa de cada uma delas pode ser calculada pelo modelo de mistura, que simplesmente é um balanço de massa combinado a um balanço isotópico.

O sistema de equações é o método quantitativo em função do balanço de massa isotópico, que permite mensurar os índices participativos das fontes no produto (DUCATTI, 2007).

$$\text{Produto} = \text{Fonte } F_1 + \text{Fonte } F_2$$

$$\delta^{13}\text{C} = a \delta F_1 + b \delta F_2 \quad (1)$$

$$\delta^{15}\text{N} = a \delta' F_1 + b \delta' F_2 \quad (2)$$

Onde:

- Fonte F_1 = soja
- Fonte F_2 = carne
- Produto = hambúrguer
- δF_1 e δF_2 = enriquecimento isotópico relativo do Carbono das fontes F_1 de carbono C_3 (soja) e das fontes F_2 de carbono C_4 (carne), respectivamente.
- $\delta' F_1$ e $\delta' F_2$ = enriquecimento isotópico relativo do Nitrogênio das fontes F_1 de nitrogênio C_3 (soja) e das fontes F_2 de nitrogênio C_4 (carne), respectivamente.
- $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ = enriquecimento isotópico relativo do produto (hambúrguer) para Carbono-13 e Nitrogênio-15, respectivamente.

Isolando o valor (b) da equação (1) e da equação (2) e igualando entre si, obtém-se o valor de (a), ou seja, o índice participativo da fonte de soja.

$$\frac{\delta^{13}\text{C} - a \delta F_1}{\delta F_2} = \frac{\delta^{15}\text{N} - a \delta' F_1}{\delta' F_2}$$

$$a = \frac{\delta^{13}\text{C} \delta' F_2 - \delta^{15}\text{N} \delta F_2}{\delta F_1 \delta' F_2 - \delta' F_1 \delta F_2} \quad (3)$$

Substituindo o valor de (a) na equação (1) ou na equação (2), obtém-se o valor de (b), ou seja, o índice participativo da fonte de carne.

$$b = \frac{\delta^{15}N\delta F_1 - \delta^{13}C\delta'F_1}{\delta F_1\delta'F_2 - \delta'F_1\delta F_2} \quad (4)$$

Obtendo $a + b = 1$, uma vez que existem somente duas fontes participativas e um produto.

Os resultados encontrados permitiram estabelecer valores limitantes para os produtos que seguem a Instrução Normativa vigente, sendo -13,8‰ a -15,23‰ (-14,2‰ $\pm$ 0,73) ou mais enriquecido para Carbono-13 e 4,94‰ a 5,46‰ (5,2‰ $\pm$ 0,73) ou mais enriquecido para Nitrogênio-15.

As amostras que se encontram no intervalo (área de incerteza) destes valores são as 10 amostras da marca G.

Neste modelo de legalidade, o intervalo de 5% dado para as áreas de incerteza contemplou as possíveis falhas dos procedimentos da metodologia isotópica, como a homogeneização não satisfatória das amostras, imprecisão de pesagem e o erro experimental da ordem de 0,2‰ para análise de Carbono-13 (DUCATTI, 2014).

Além disso, os hambúrgueres também podem apresentar falta de liga da massa, que acontece quando, no momento da inclusão, a proteína texturizada de soja não está completamente hidratada ou quando a mistura dos ingredientes com as carnes não foi adequadamente conduzida (TERRA, 1998).

Todas as outras amostras das 9 marcas comerciais brasileiras de hambúrgueres apresentaram maior adição de 4% de proteína de soja, burlando a legislação específica (IN nº 20 de 07/31/2000).

Quase todos os alimentos possuem uma Norma Técnica Especial para Alimentos (NTA), onde constam as especificações padrão que devem ser seguidas e respeitadas. Sendo assim, qualquer alimento que apresente características fora das especificações legais é considerado fraudado (KOLICHESKI, 1994).

5.2.2. Determinação da porcentagem de carne nas amostras de hambúrgueres comerciais bovinos

Como alternativa para analisar os resultados em questão, foi estimada uma reta em função dos valores isotópicos de amostras controle de hambúrgueres à base de soja (100% soja) e à base de carne (100% carne), com área de confiabilidade de 95% (Figura 6).

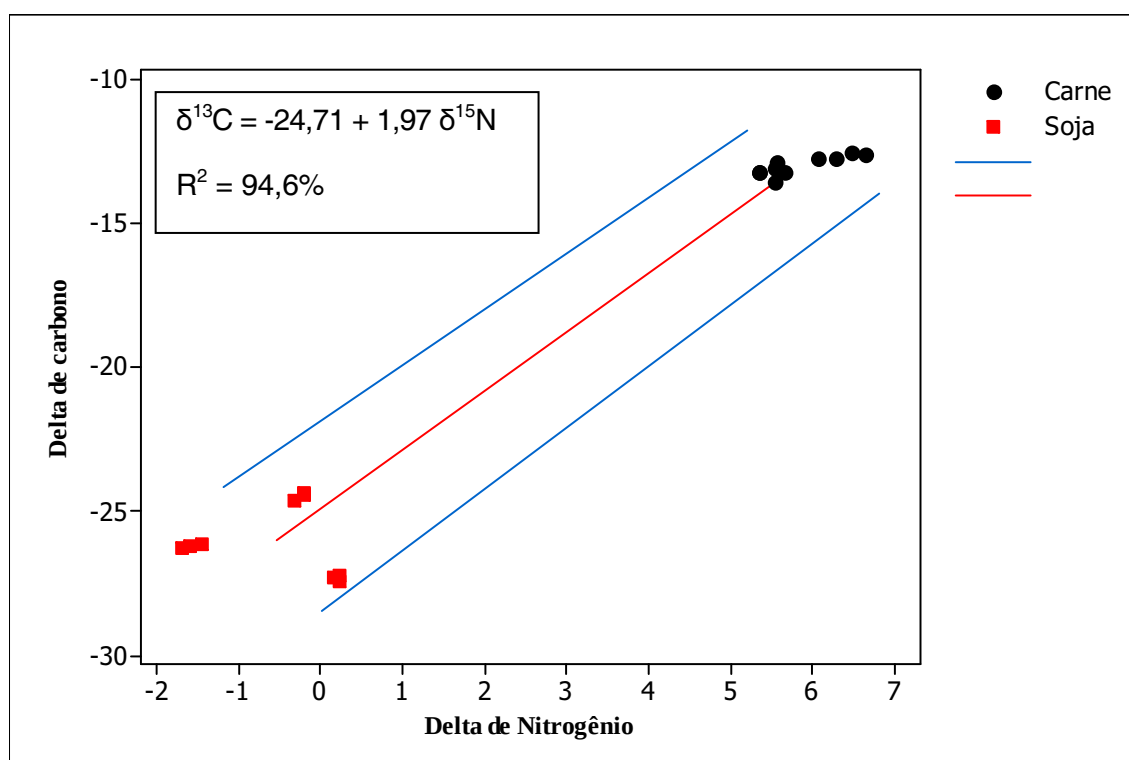


FIGURA 6. Reta padrão a partir dos dados isotópicos de Carbono e Nitrogênio das amostras controles de carne e soja.

Para determinar a legalidade dos hambúrgueres comerciais de carne bovina, calculou-se através do sistema de equações (1) e (2) (Figura 7), o par isotópico ($\delta^{13}\text{C} = -13,5\%$ e $\delta^{15}\text{N} = 5,58\%$) correspondente aos 4% (▲) de adição de proteína de soja permitida pela legislação.

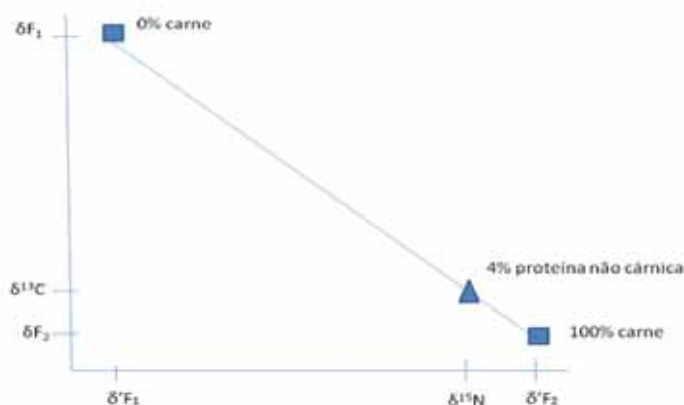


FIGURA 7. Modelo do sistema de equações

Através da regressão linear e do coeficiente de determinação (0,99), pode-se perceber que a reta está bem ajustada aos pontos (Figura 8). O intervalo de confiança compreende uma faixa de valores que é ligeiramente mais larga nas extremidades da reta do que nos pontos intermediários, onde devido ao estreitamento, apresenta maior precisão. É justamente nesses pontos intermediários que estão os limites no uso de proteína de soja, estipulado pela legislação.

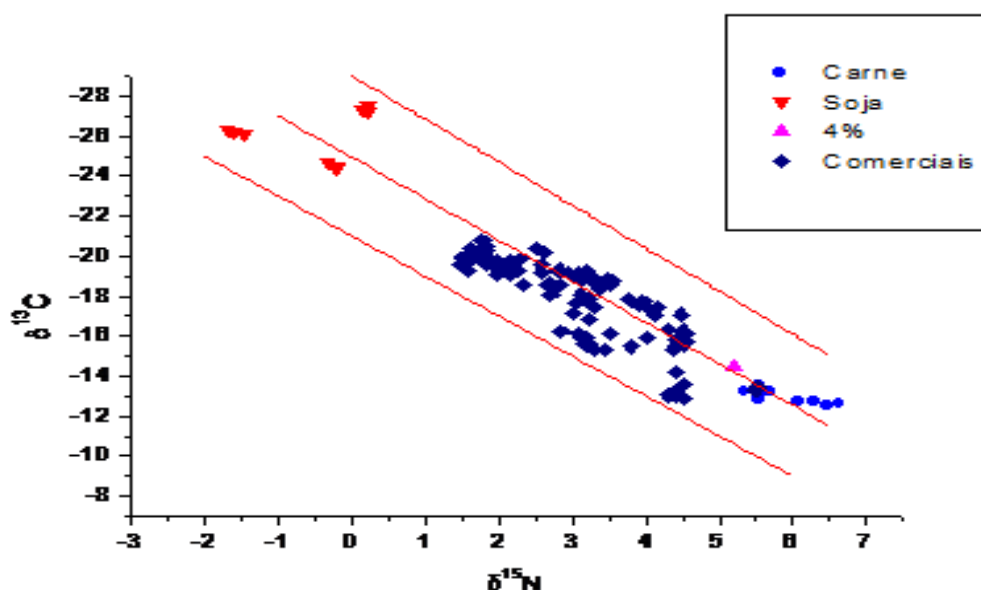


FIGURA 8. Reta padrão a partir dos dados isotópicos de Carbono e Nitrogênio das amostras controles de carne e soja e análise das amostras de hambúrgueres comerciais.

A Figura 8 mostra claramente a diminuição no valor de $\delta^{13}\text{C}$ dos hambúrgueres com o aumento da porcentagem da proteína de soja utilizada nas formulações pelas indústrias, ou seja, a medida a proteína de soja foi adicionada, o valor do enriquecimento isotópico dos hambúrgueres tendeu a se aproximar do $\delta^{13}\text{C}$ da proteína de soja (-26,02‰) e se afastar do $\delta^{13}\text{C}$ (-12,99‰) da carne. O mesmo ocorreu com os valores de nitrogênio, quanto maior a quantidade de proteína de soja adicionada pelas empresas, menor o valor de $\delta^{15}\text{N}$, ou seja, mais próximo de -0,54‰ (100% soja) e mais distante de 5,84‰ (100% carne).

Apenas as 10 amostras controle de carne (L) e 3 amostras da marca G encontraram-se abaixo do ponto correspondente aos 4% permitido pela IN. As porcentagens médias de adição de proteína de soja das 10 marcas comerciais brasileiras nos hambúrgueres bovinos encontram-se na tabela 9.

TABELA 9. Porcentagens médias de proteína de soja e de carne das 10 marcas comerciais brasileiras nos hambúrgueres bovinos

MARCA	% PROTEÍNA DE SOJA	% CARNE
A	42,7% (37-53%)	57,3%
B	58,1% (52-62%)	41,9%
C	53,3% (46-57%)	46,7%
D	58,7% (52-61%)	41,3%
E	29,5% (22-35%)	70,5%
F	21,9% (20-25%)	78,1%
G	10,2% (4-6%)	89,8%
H	30,9% (26-36%)	69,1%
I	42,9% (39-48%)	57,1%
J	44,6% (35-54%)	55,4%

As marcas B (41,9%), C (46,7%) e D (41,3%) foram as que apresentaram menor quantidade de carne bovina em sua composição, ou seja mais da metade dos hambúrgueres foram compostos por proteína de soja.

Alimentos, como os hambúrgueres bovinos analisados, que apresentam em sua formulação alta porcentagem de produtos a base de soja, possuem fortes propriedades antigênicas evidenciadas em estudos *in vivo* e *in vitro*.

De acordo com o FDA (2013), existem mais de 160 alimentos que podem causar alergia em pessoas e 90% dos casos de reações alérgicas estão ligados a oito alimentos (leite, ovos, peixe, crustáceos, nozes, amendoim, trigo e soja). Estes alimentos e qualquer ingrediente que contenha proteína derivada de um ou mais deles, são designados alergênicos e devem ser mencionados na rotulagem.

Os riscos ao bem-estar aumentam a medida que os alimentos consumidos em uma população são cada vez mais processados e complexos, com rótulos inadequados (TAYLOR; HEFLE, 2006).

A inexistência de informações a respeito dos constituintes do produto, cuja indicação é obrigatória, é ainda mais grave em relação a alguns consumidores que podem sofrer reações alérgicas severas (ESQUIVEL, 2009).

A legislação referente ao emprego dos aditivos alimentares é alterada de acordo com novos conhecimentos e avaliações a seu respeito, em vista, principalmente da suficiente margem de garantia de dose estipulada, de modo a evitar danos à saúde do consumidor (ESQUIVEL, 2009).

5.2.3. Análise de Componentes Principais (PCA)

Na Figura 9 estão representados os grupos formados pela Análise de Componentes Principais (PCA). A primeira componente demonstra 98% da informação e é mais influenciada pelo $\delta^{13}\text{C}$ e a segunda componente, representa apenas 2% da informação, sendo mais influenciada pelo $\delta^{15}\text{N}$ dos hambúrgueres.

Os grupos formados pelas marcas F, G, E e H apresentaram características isotópicas diferentes das demais marcas, revelando maior variação nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (Figura 9).

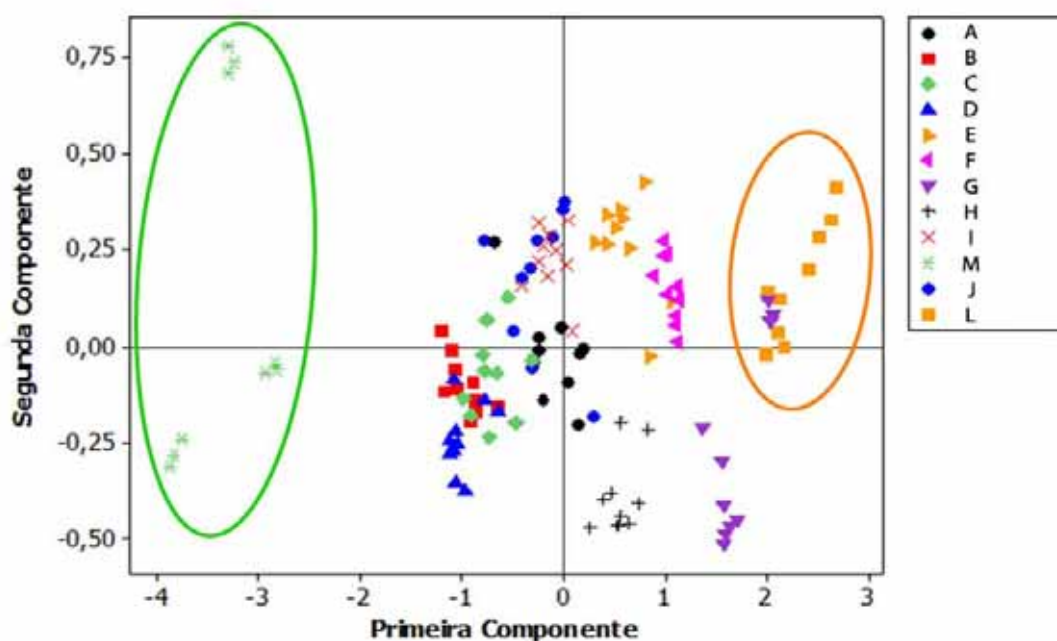


FIGURA 9. Análise de Componentes Principais para os valores do par isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras de hambúrgueres.

Observa-se que todas as amostras 100% soja M (•) formam um grupo totalmente distinto dos demais grupos formados e o grupo formado pelas amostras 100% carne L (■) não apresenta diferença isotópica de três amostras da marca G (▼), as quais pertencem a um lote (31/10/12 manhã) diferente do lote (22/12/12 tarde) das outras 7 amostras da mesma marca.

Essa diferença entre as amostras da mesma marca G pode estar associada às práticas fraudulentas dos produtores de alimentos que empregam aditivos não autorizados, fora dos limites permitidos ou de maneira incorreta, geralmente visando às melhores condições competitivas e, sobretudo, ao lucro (ESQUIVEL, 2009).

6. CONCLUSÕES

As marcas H (amostras 1 e 7), B (amostra 5), D (amostra 5), E (amostra 5), G (amostra 4) e L (amostra 6) apresentaram padrões bacteriológicos insatisfatórios, ou seja, são hambúrgueres considerados impróprios para consumo por apresentarem risco à saúde do consumidor

Em relação à presença da proteína de soja, a técnica dos isótopos estáveis certificou que apenas 3 amostras de hambúrgueres bovinos da marca G apresentaram valores dentro do permitido pela IN n° 20 de 07/31/2000. As outras 97 amostras das 10 marcas comerciais brasileiras apresentaram mais de 4% de adição de proteína de soja, ou seja, encontram-se fora da legislação nacional específica em vigor.

Este trabalho definiu uma metodologia inédita para a quantificação da porcentagem de proteínas não cárnicas nos hambúrgueres bovinos. A técnica dos isótopos estáveis poderá garantir a autenticidade das informações nos rótulos e fornecer uma possível certificação das normas dos produtos em questão.

7. BIBLIOGRAFIA

AC NIELSEN. São Paulo: AC Nielsen, 2003. Disponível em: <http://www.nielsen.com/br/pt.html>. Acesso em: 29 maio 2014.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003, 989 p.

ADAK, G. K.; MEAKINS, S. M.; YIP, H.; LOPMAN, B. A.; O'BRIEN, S. J. Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. **Emerging Infectious Disease Journal** **11**: 365-372, 2005.

AGATER, I. B.; BRIANT, K. J.; LLEWELLYN, J. W.; SAWYER, R.; BAILEY, F. J.; HITCHCOCK, H. S. The determination of soya and meat protein in raw and processed meat products by specific peptide analysis. An evaluation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 37, n. 3, p. 317-331, 1986.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 18.ed. Gaithersburg, 2005. Cap.39, p.1-24.

BAHAR, B.; MONAHAN, F. J.; MOLONEY, A. P.; O'KIELY, P.; SCRIMGEOUR, C. M.; SCHMIDT, O. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 1937-4942, 2005.

BAHAR, B.; SCHMIDT, O.; MOLONEY, A. P.; SCRIMGEOUR, C. M.; BEGLEY, I. S.; MONAHAN, F. J. Seasonal variation in the C, N and S stable isotope composition of retail organic and conventional Irish beef, **Food Chemistry**, v. 106, p. 1299, 2008.

BAILEY, F.J. A novel approach to the determination of soya proteins in meat products using peptide analysis. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.27, n.9, p.827-830, 1976.

BARRIE, A.; PROSSER, S. Automated analysis of light element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S-I (Ed.). **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996, p.1-46.

BEACH, J. C.; MURANO, E. A.; ACUFF, G. F. Serotyping and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* in feedlot and nonfeedlot beef cattle. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 11, p. 1694-1699, 2002.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Salmonella: a practical approach to the organism and its control in foods**. Iowa: Blackwell Science, 2002.

BELLOQUE, J.; GARCÍA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L. Analysis of soyabean proteins in meat products: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 5, p. 507-532, 2002.

BEMIS, E. B.; KENDALL, C. **Isotopic views of food web structure in the Florida Everglades**. Menlo Park: USGS, 2004. Fact sheet, FS -3138.

BENDER, M. Variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of plant in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1239-1244, 1971.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. 829p.

BONER, M.; FORSTEL, H. Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 378, 301 (2004).

BOURGEOIS, C. M.; MESCLE, J. F.; ZUCCA, J. **Microbiologia alimentaria**. Madrid: Zaragoza, 1994, p. 437.

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of natural materials: I. sample preparation and mass spectrometric analysis. In: COLEMAM, D. C.; FRY, B. **Carbon isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1991. cap. 10, p. 155-171.

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S. **Mass Spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. chap. 2, p. 47-82.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos. **Curso de sensibilização**. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2008, 74p.

BRASIL. **Código de Defesa do Consumidor**. Nova ed. rev., atual. e ampl. com o Decreto nº 2.181, de 20 de março de 1997. Brasília: Ministério da Justiça, 2001a. 120 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer. Instrução Normativa nº 20 de 31/07/2000. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 31 jul. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução Normativa nº4, de 05 de fevereiro de 2001. Aprova a Metodologia de Análise da Razão Isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em Produtos e Subprodutos das Plantas do Ciclo Fotossintético C_3 e C_4 . **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2001b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura. **Cadeia produtiva da carne bovina**. Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007. 86 p. (Agronegócios, v. 8).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e bubalinos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 25 mar. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan. 2001.

BRENNER, J. T.; CORSO, T. N.; TOBIAS, H. J.; CAIMI, R. J. High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 16, p. 227-258, 1997.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2001.

BRESCIA, M.A., MONFREDA, M., BUCCOLIERI, A., CARRINO, C. Characterization of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations. **Food Chemistry**, v. 89, p. 139, 2005.

BRESSAN, M. C., ABREU, L. R.; LOBATO, V.; PEREZ, J. R. O. **Introdução geral**: os alimentos de origem animal. Textos Acadêmicos. Lavras: UFLA. 5-65 p. 1999.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012.

CÂMARA, S. A. V. Surtos de toxinfecções alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, 1998-2001. 2002. Monografia (Especialização em Saúde Pública). Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser, Campo Grande, MS, 2002.

CAMIN, F.; WIETZERBIN, K.; CORTES, A. I. B.; HABERHAUER, G.; LEE, M.; VERSINI, G. Application of multielement stable isotope ratio analysis to the characterization of French, Italian, and Spanish cheeses, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6592, 2004.

CARDOSO, M. Doenças transmitidas por alimentos de origem suína. In: SIMPÓSIO UFRGS SOBRE MANEJO, REPRODUÇÃO E SANIDADE SUÍNA, 1, 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2006. p. 92-103.

CARMO, L.; DIAS, R.; ANUNCIAÇÃO, L.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 47, p. 113-122, 1995.

CASSIN, M. H.; LAMMERDING, A. M.; TODD, E. C. D.; ROSS, W.; McCOLL, R. S. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* 0₁₅₇:H₇ in ground beef hamburgers, **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 21-44, 1998.

CASTRO-RUBIO, F.; GARCÍA, M. C.; RODRÍGUEZ, R.; MARINA, M. L. Simple and inexpensive method for the reliable determination of soybean proteins in heat-processed meat products: an alternative to the AOAC official method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 220-226, 2005.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. Update: *Clostridium Perfringens* gastroenteritis associated with corned beef served at St. Patrick's Day Meals – Ohio e Virginia, 1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 43, p. 137-138, 1994.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ infections from hamburgers, Western United States, 1992- 1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 42, n. 14, p. 258-263, 1993.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. Preliminary foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – selected sites, United States, 2003. *MMWR*, v. 53, p. 338-343, 2004a.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. **Foodborne outbreak response and surveillance unit**. Atlanta: CDC, 2004.

CHRISTOVÃO, D. A. Bacteriologia da água. Seu exame e controle bacteriológicos. In: _____. **Água: qualidade, padrões de potabilidade e poluição**. São Paulo: CETESB, p.103, 1977.

CLARK, I. D.; FRITZ, P. The environmental isotopes. In: CLARK, I. D.; FRITZ, P. **Environmental isotopes in hidrogeology**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1997. cap. 1, p. 5.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Appendix IV. Working principles for risk analysis for application in the framework of the Codex Alimentarius. In: _____. **Report of the Twenty - Sixty session of the Codex Alimentarius Commission**. Rome: WHO, 2003.

COELHO, M. S. L.; GUIMARÃES, W. V.; BORGES, A. C.; SILVA, D. O.; ARAÚJO, E. F. Sobrevivência de *Salmonella* em carne bovina moída armazenada em baixas temperaturas. **Revista Microbiológica**, São Paulo, v. 15, n.1, p. 17-23, 1984.

CONTRERAS, C. Qualidade microbiológica da carne de aves. CTC – Tecnocarnes. **Boletim de Conexão Industrial de Centro de Tecnologia de Carnes de ITAL**, v. 7, n. 5, p. 38-39, 2002.

COPLEN, T. B. et al. Isotope-abundance variations of selected elements. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 1987-2017, 2002.

COSTA, L. O. **Processamento e diminuição do reprocesso do hambúrguer bovino (HBV)**. 2004. 127 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2004.

CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 12, p. 133-149, 1957.

CRIMES, A. A.; HITCHCOCK, C. H. S.; WOOD, R. Determination of soya protein in meat products by an enzyme-linked immunosorbent assay procedure: collaborative study. **J. Assoc. Publ. Analysts**, v.22, p. 59-78, 1984.

CUNHA, M. A. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 1, n. 1, p. 9-13, 2006.

DARGATZ, D. A.; FEDORKA-CRAY, P. J.; LADELY, S. R.; FERRIS, K. E. Survey of *Salmonella* serotypes shed in feces of beef cows and their antimicrobial susceptibility patterns. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1648–1653, 2000.

DAVIES, R. Salmonellosis. In: WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 5. ed. Cap. 2.10.3, 2004.

DELGADO, T. R. **Estudo de caso do gerenciamento de alergênicos dentro da BRC food standard (norma global de segurança de alimentos)**. 2011. Monografia (Especialização) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2011.

DUCATTI, C. Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, *suplemento especial*, p.01-10, 2007.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Curso de Pós Graduação. Disciplina: Aplicação de Isótopos Estáveis Ambientais. Botucatu: Programa de Pós Graduação em Zootecnia, FMVZ/UNESP, 2014. Apostila.

ESQUIVEL, C. L. W. Crimes contra a saúde pública: fraude alimentar. Curitiba: Juruá Editora, 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. **European Food Safety Authority Journal**, v. 10, n. 3, p. 2597, 2012.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; VIEIRA, R. H. S. F. *Salmonella* versus manipuladores de alimentos: um fator de risco para os consumidores. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 15-19, 2002.

FLINT, F. O.; FIRTH, B. M. Histochemical demonstration of collagen in comminuted meat products. **Analyst**, v. 108, n. 6, 757-759, 1983.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Food safety risk analysis: an overview and framework manual**. Part I. Provisional Edition. Rome: FAO, 2005.

FARQUHAR, G. D.; EHLERINGER, J. R.; HUBICK, K. T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 503-537, 1989.

FEDORKA-CRAY, P. J.; DARGATZ, D. A.; THOMAS, L. A.; GRAY, J. T. Survey of *Salmonella* serotypes in feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 525-530, 1998.

FERNANDES, F. F.; MIRANDA, Z. B. Estudo comparativo entre a mortadela tipo Bolonha e a imitação de mortadela sob diversos aspectos. **Higiene Alimentar**, v. 15, p. 54-66, 2001.

FERREIRA, A. **Espectrometria de massa de razões isotópicas**. 2008. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008. cap. 43, p. 329-338.

FOCKEN, U. Feeding fish with diets of different ratios of C₃- and C₄-plant-derived ingredients: a laboratory analysis with implications for the back-calculation of diet from stable isotope. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.18, p. 2087, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food Allergies:** what you need to know. Disponível em: <
<http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm079311.htm> >
 Acesso em: 19 mar. 2014.

FORSTEL, H. The natural fingerprint of stable isotopes—use of IRMS to test food authenticity. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 3, p. 541-544, 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

FREITAS NETO, O. C.; PENHA FILHO, R. A. C.; BARROW, P.; BERCHIERI JUNIOR, A. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.12, n. 1, p. 1-11, 2010.

FRIEDMAN, I.; O'NEIL, J. R. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. In: FLEISCHER, M. (Ed.). **Data of geochemistry**, 6. ed. Washington: United States Government Printing Office, 1977, p. kk1-kk12.

FRY, B. Food web structure on Georges bank from stable C, N, and S isotopic compositions. **Limnology and Oceanography**, v. 33, n. 5, p. 1182–1190, 1988.

GANNES, L. Z.; DEL-RIO, C. M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecological. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119A, p. 725-737, 1998.

GAYE-SIESSEGGGER, J.; FOCKEN, U.; MUETZEL, S.; ABEL, H.; BECKER, K. Feeding level and individual metabolic rate affect $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in carp: implications for food web studies. **Oecologia**, v. 138, p. 175, 2004.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

GILL, C. O.; BRYANT, J.; BADONI, M. Effects of hot water pasteurizing treatments on the microbiological condition of manufacturing beef used for hamburger patty manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 243-256, 2001.

GILL, C. O.; MCGINNIS, J. C.; BADONI, M. Assessment of the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 2, p. 136-140, 1996.

GONÇALVES, L. A. **Seleção de colônias de *Clostridium perfringens* tipo D produtoras de toxina épsilon por “Dot Blot”**. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2004.

GUERRANT, R. L.; VAN GILDER, T.; STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R. V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P. M.; DUPONT, H.; SACK, R. B.; TARR, P.; NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L. B.; OSTERHOLM, M. T.; BENNISH, M. L.; PICKERING, L. K. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, v. 32, p. 331-350, 2001.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Supplement 2003 – 2007 (n° 47) to the White- Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26- 29, 2010.

GRIFFITHS, N. M., BILLINGTON, M. J.; GRIFFITHS, W. A review of three modern techniques available for the determination of soya protein in meat products. **Journal of the Association of Public Analysts**, v. 19, n. 4, p. 113-119, 1981.

HANDLEY, L. L.; RAVEN, J. A. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. **Plant Cell and Environment**, v. 15, p. 965-985, 1992.

HAYNES, R. J. **Mineral nitrogen in the plant-soil system**. Londres: Academic Press, 1986. 483p.

HEUVELINK, A. E.; ROESSINK, G. L.; BOSBOOM, K.; BOER, E. Zero tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O₁₅₇ VTEC infections. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 66, n. 1-2, p. 13-20, 2001.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1999. 425p.

HOOGENKAMP, H. W. Meat Patties: formulations for today's consumer. **Meat international**. v. 6, n. 6, p. 30-32, 1996.

IARIA, S. T.; FURLANETO, S. M. P.; CAMPOS, M. L. C. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais. **Revista Saúde Pública**, v. 14, p. 93-100, 1980.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Listeria monocytogenes**. **Microorganismos de los alimentos**: características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1998. 606 p.

INGRAM, M.; SIMONSEN, Y. B. Carne y productos cárnicos. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Ecología microbiana de los alimentos 2**. Zaragoza: Acribia, 1985. p. 333-409.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **II Curso Internacional Sobre Tecnologia da carne**. Campinas: ITAL, 1981.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BÈS, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *EGC*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v.166, p. 669-677, 2001.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acriba, 1994. 804 p.

JUNEJA, V.K.; SNYDER JUNIOR, O. P.; WILLIAMS, A. C.; MARMER, B. S. Thermal destruction of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ in hamburger. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 1163-1166, 1997.

JUNQUEIRA, V. C. A.; NETO, R. C.; SILVA, N. Ocorrência de esporos de *Clostridium perfringens* em amostras de águas brutas e tratadas, na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 144, p. 106-109, 2006.

KASNOWSKY, M. C. **Listeria spp. Escherichia coli**: isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. 2004. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

KEELEY, J. E.; SANDQUIST, D. R. Carbon: freshwater plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 15, p. 1021-1035, 1992.

KELLY, S. D. Using stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in food authentication and traceability. In: LEES, M. (Ed.). **Food authenticity and traceability**. Londn: Woodhead, 2003. cap. 7, p. 156-183.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 68, p. 960-972, 1990.

KOLICHESKI, M. B. Fraudes em alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 12, n. 1, p. 64-80, 1994.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1465 p. 2001.

KRUEGER, D. A. Applications of stable ratio analysis to problems of fruit juice adulteration. In: NAGY, S.; ATTAWAY, J. A.; RHODES, M. E. **Adulteration of fruit juice beverage**. 2.ed. New York: M.Decker, 1995. chap.7, p.109-124.

LABBE, R. G. Relationship between sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens* type A. **Food Technology**, v. 34, n. 4, p. 88-90, 1980.

LABBE, R. G. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies *Clostridium perfringens*. **Journal of Official Analytical Chemists**, v. 74, n. 4, p. 711-714, 1991.

LABBE, R. G.; HUANG, T. Generation times and modeling of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative strains of *Clostridium perfringens* in laboratory media and ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 58, p.1303-1306, 1995.

LAJTHA, K.; MARSHALL, J. D. Sources of variation in the stable isotopic composition of plants. In: LAJTHA, K.; MICHENER, R.H. (Ed.). **Stable isotopes in ecology and environmental science**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. cap. 1, p. 1-21.

LEITNER, A. et al. Identification of marker proteins for the adulteration of meat products with soybean proteins by multidimensional liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v.5, n.9, p.2424-2430, 2006.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 63-76, 2003.

LEMAIRE, W. H. Foot long hamburger. **Food Engineering**, v. 50, n.12, p.ef 3, 1978.

LICATTI, F. **Isótopos Estáveis do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) em plantas do ciclo bioquímico C_3 e C_4** . Trabalho de conclusão de curso (Monografia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 1997.

LINDQVIST, R.; ANDERSSON, Y.; LINDBÄCK, J.; WEGSCHEIDER, M.; ERIKSSON, Y.; TIDESTRÖM, L.; LAGERQVIST-WIDH, A.; HEDLUND, K. O.; LÖFDAHL, S.; SVENSSON, L.; NORINDER, A. A one-year study of foodborne illnesses in the municipality of Uppsala, Sweden. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 7, p. 588-592, 2001.

MANCA, G.; CAMIN, F.; COLORU, G. C.; DEL CARO, A.; DEPENTORI, D.; FRANCO, M. A. Characterization of the geographical origin of Pecorino sardo cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid ratios, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1404, 2001.

MARCHI, P. G. F. **Estudo comparativo do estado de conservação de carne moída através de métodos microbiológicos e físico-químicos**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

MARTINELLI, L. A.; FERRAZ, E. S. B.; OMETTO, J. P. H. B.; MOREIRA, M. Z.; CAMARGO, P. B.; VICTORIA, R. L. **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. São Paulo: Oficina de Textos, 2009. 144 p.

MARTINELLI, L. A.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E.; FORSBERG, B. R. Utilização das variações naturais de $\delta^{13}\text{C}$ no estudo de cadeias alimentares em ambientes aquáticos: princípios e perspectivas. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 1, p. 859-882, 1988.

MCEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A. The prevalence of *Salmonella* spp. In bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 693-700, 2003.

MELLENTHIN, O.; GALENSA, R. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 594-602, 1999.

MENDES, A. C. R.; SANTANA NETA, L. G.; COSTA, D. S.; ALMEIDA, J. F. Condições de comercialização de cortes cárneos em supermercados da cidade de Salvador, BA. Aspectos higiênico-sanitários e de conservação. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 83, p. 58-62, 2001.

MINAGAWA, M.; WADA, E. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 48, p. 1135-1140, 1984.

MORRIS, J. G. Current trends in human diseases associated with foods of animal origin. **Public Veterinary Medicine**, v. 15, p. 209, n. 12, 1996.

MUNUERA, I.; GARCIA, D.; IBÁÑEZ, J. J. Niveles guía, límites máximos admisibles, criterios microbiológicos y otros valores de referencia en análisis microbiológicos de alimentos y bebidas. Vacíos legales, emisión de dictámenes. **Alimentaria**, v. 281, p. 39-42, 1997.

NASCIMENTO, M. G. F.; NASCIMENTO, E. R. **Importância da avaliação microbiológica na qualidade e segurança dos alimentos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. p. 11 (Embrapa, Agrobiologia) – Documentos, 120.

NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. Hambúrguer: evolução comercial e padrões microbiológicos. **Boletim do CWPPA**, v. 23, n. 1, p. 59-74, 2005.

NORMAN, A. G.; WERKMAN, C. H. The use of the nitrogen isotope N-15 in determining nitrogen recovery from plant materials decomposing in soil. **Agronomy Journal**, v. 35, n. 12, p. 1023-1025, 1943.

O'LEARY, M. O. Carbon isotopes in photosynthesis- Fractionation techniques may reveal new aspects of carbon dynamics in plants. **BioScience**, v. 38, n. 5, p.328-336, 1988.

O'LEARY, M. H. Carbon isotope fractionation in plants. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 553-567, 1981.

OLIVEIRA, A. C. B. Isótopos estáveis e produção de bebidas: de onde vem o carbono que consumimos? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 22, p. 285-288. 2002.

OLIVEIRA, A. M. C.; LUCENA, S. C. A.; SALES, T. F. S. M.; SILVA, V. B.; COSTA, M. L. M. Avaliação de alimentos comercializados no carnaval da cidade do Recife – 2001. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA 21., 2001 Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2001.

OLIVO, R. Tecnologia da Extensão Cárneas. In: SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B. D. G. M. **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes**. São Paulo: Livraria Varela, 2006. p. 175-184.

OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOULDING, J. S.; BEAN, N. H.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States, 1993-1997. *MMWR*, v. 49, p. 1-51, 2000.

PANETTA, J. C. Prevalência e controle de enfermidades humanas transmitidas pela ingestão de carne bovina. **Higiene Alimentar**, v. 8, n. 32, p. 19-20, 1994.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. Rio de Janeiro: UFG/EDUFF, 2001. v. 1-2, p.1110.

PASSOS, M. H. C. R.; KUAYE, A. Y. Avaliação dos laudos analíticos, de alimentos coletados pela vigilância sanitária de Campinas – SP, no período de 1987 a 1993. **Higiene Alimentar**, v. 10, p. 7-10, 1996.

PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. Advances in meat research. Connecticut: Avi Publishing Company. 1986, 436 p. v. 2: **Meat and Poultry Microbiology**.

PERDIGÃO. Resultados 2º trimestre 2006. Disponível em: <<http://www.perdigao.com.br>>. Acesso em: 30 maio 2014.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 6, p. 406-409, 1994.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. F.; RODRIGUES, C. A.; FERNANDES, S. A.; GELLI, D. S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella Enteritidis*. **Revista Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 477-83, 1998.

PHILIPS, D. L. Mixing models in analyses of diet using multiple stable isotopes: a critique. **Oecologia**, v. 127, p. 166-170, 2001.

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

PORTO, P. **Otimização de análise isotópica de UF₆ utilizando-se a técnica de espectrometria de massas por quádrupolo**. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PRESTON, T. The measurement of stable isotope natural abundance variations. **Plant Cell and Environment**, v. 15, p. 1091-1097, 1992.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la carne y de los productos carnicos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 581p.

QUEIROZ, E. C. **Utilização dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio na detecção de adulteração e avaliação energética de bebidas de laranja**. 2005. 84f. Tese (Doutorado em Agronomia – Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

QUEIROZ, Y. U.; DAUD, K. O.; SOARES, R. A. M.; SAMPAIO, G. R.; CAPRILES, V. D.; TORRES, E. A. F. S. Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas de hambúrgueres com reduzidos teores de gordura e de colesterol. **Revista Nacional da Carne**, v. 338, p. 84-89, 2005a.

RANGEL J. M.; SPARLING, P. H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P. M.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ outbreaks, United States, 1982-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v 11, p. 603-609, 2005.

REID, L. M.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 7, p. 344-353, 2006.

RENOU, J. P.; DEPONGE, C.; GACHON, P.; BONNEFOY, J. C.; COULON, B.; GAREL, J. P.; VÉRITÉ, R.; RITZ, P. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. **Food Chemistry**, v. 85, p. 63, 2004.

RITZ, P.; GACHON, P.; GAREL, J. P.; BONNEFOY, J. C.; COULON, J. B.; RENOU, J. P. Milk characterization: effect of the breed. **Food Chemistry**, v. 91, p. 521, 2005.

ROÇA, R. O. Composição química da carne. **Material didático**. Botucatu: Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal. Fazenda Experimental Lageado, F.C.A., Universidade Estadual Paulista. Disponível em: <http://www.engq.ufsc.br/disci/eqa5217/material_didatico/composicao_quimica_da_carne.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2014.

RODRIGUES, R. M. M. S. **Detecção e quantificação de proteína texturizada de soja em salsichas**. São Paulo, 1986. 95p. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

ROMANS, J. R.; COSTELLO, W. J.; JONES, K. W. **The meat we eat**. 12. ed. Illinois: The Inter-State Printers and Publishers, 850 p. 1985.

ROSA, C. R.; MORAES, M.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. Effect of modifiers on thermal behavior of Se in acid digestates and slurry of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 79, p. 517-523, 2002.

ROSSMANN, A. Determination of stable isotopes ratios in food analysis. **Food Reviews International**, v. 17, p. 347-381, 2001.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Editora Manole, 1987.

SAAB, M. S. B. L. M. **Valor percebido pelo consumidor**: um estudo de atributos da carne bovina. 1999. 116 f. Dissertação (Mestrado em Administração) – Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. **Caracterização da carne bovina**. Boletim Técnico - PIE-UFES: 00807 - Editado: 20.08.2007.

SHIBUYA, E. K.; SARKIS, J. E. S.; NETO, O. N.; MOREIRA, M. Z.; VICTORIA, R. L. Souring Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International**, v. 160, p. 35-43, 2006.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 475 p.

SILVA, B. M.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B.; OLIVEIRA, M. B.; FERREIRA, M. A. Adulteração por adição de açúcares a sumos de frutos: uma revisão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 184-191, 1999.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 5. ed. São Paulo: Varela, 2002. 479 p.

SILVA JUNIOR, E. A.; MARTINS, E. A. Análise microbiológica em cozinhas industriais. **Higiene Alimentar**, v. 5, n. 17, p. 20–24, 1991.

SILVA, C. S. A. **Avaliação Microbiológica de Enchidos de Ovino e Caprino**. 2012. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007.

SIQUEIRA, R. S. Manual de Microbiologia de Alimentos. EMBRAPA. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995, 159 p.

SMITH, B. N.; EPSTEIN, S. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of higher plants. **Plant Physiology**, v. 47, p. 380-384, 1971.

SMITH, B. N.; BROWN, W. V. The Kranz Syndrome in the gramineae as indicated by carbon isotope ratios. **American Journal of Botany**, v. 60, n. 6, p. 505-513, 1973.

SOCKETT, P. N. The epidemiology and costs of diseases of public health significance in relation to meat and meat products. **Journal of Food Safety**, v. 15, p. 91-112, 1995.

SORIANO, J. M.; FONT, G.; RICO, H.; MOLTO, J. C.; MANES, J. Incidence of enterotoxigenic staphylococci and their toxins in foods. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 857-860, 2002.

SPENCER, E. H.; FRANK, E.; MCINTOSH, N. F. Potential effects of the next 100 billion hamburgers sold by McDonald's. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 28, n. 4, p. 379-381, 2005.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 31-41, 2002.

TAVARES, T. M.; SERAFINI, A. B. Avaliação Microbiológica de Hambúrgueres de Carne Bovina Comercializados em Sanduicherias Tipo Trailers em Goiânia (GO). **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, n. 1, p. 45-52, 2003.

TAYLOR, S. L.; HEFLE, S. L. Food allergen labeling in the USA and Europe. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 6, p.186-90, 2006.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: UNISINOS, 1998. 216 p.

THOMAS, F.; JAMIN, E.; LEES, M. Isotopic analysis of lipids as a mean of authenticating fish products. **Lipid Technology**, v. 17, n. 9, p. 204-208, 2005.

TIESZEN, L. L.; BOUTTON, T. W.; TESDAHL, K. G.; SLADE, N. A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. **Oecologia**, v. 57, p. 32-37, 1983.

TIROLI, I. C. C.; COSTA, C. A. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. **Acta Am.**, v. 36, p. 205-208, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, R. B.; CASE, C. L. **Introducción a la microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1993, 792 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TRUEMAN, C. N., MCGILL, R. A. R., GUYARD, P. H. The effect of growth rate on tissue diet isotopic spacing in rapidly growing animals. An experimental study with atlantic salmon (*Salmo salar*), **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 3239, 2005.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Food Safety and Inspection Service (FSIS)**. News & Events. News Releases. FSIS ground beef sampling shows substantial *E. Coli* O₁₅₇:H₇ decline in 2004. February 28, 2005. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/News_&_Events/NR_022805_01/index.asp>. Acesso em: 22 mar. 2014.

UNKOVICH, M.; PATE, J.; McNEILL, A.; GIBBS, D. J. **Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001. 291 p.

VALLE, E. R. **Carne Bovina**: alimento nobre indispensável. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, n. 41, 2000.

VANDER-ZANDEN, M. J.; CABANA, G.; RASMUSSEM, J. B. Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}\text{N}$) and literature dietary data. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 54, p. 1142–1158, 1997.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Carne y productos carnicos: tecnologia, quimica y microbiologia**. Zaragoza: Acribia, 1998. 423 p.

VARNAM, A. H. **Foodborne pathogens**. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. 557 p.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Processamento da carne bovina**. Disponível em: <
http://www.agais.com/telomc/b02007_processamento_bovinocorte.pdf>.
 Acesso em: 25 mar. 2014.

VOGEL, J. C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHLERINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D. **Stable isotopes and plant carbon-water relations**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 29-46.

VON RÜCKERT, D. A. S.; PINTO, P. S. A.; RODRIGUES, A. C. A.; BRAGA, M. D.; BEVILACQUA, P. D.; PINTO, M. S. Métodos de pesquisa de *Salmonella* sp. durante o abate de frangos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 146, p. 49-54. 2006.

WEBER, D. Correlations of carbon isotope ratios of wine ingredients for the improved detection of adulterations. **European Food Research and Technology**, v. 205, p. 158-164, 1997.

WERNER, R. A.; SCHMIDT, H. L. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry**, v. 61, p. 465-784, 2002.

WINKLER, F. J.; SCHMIDT, H. L. Einsatzmöglichkeiten der ^{13}C isotopenmassenspektrometrie in der lebensmitteluntersuchung. **European Food Research and Technology**, v. 171, n. 2, p. 85-94, 1980.

XIONG, Y. L. Role of myofibrillar proteins in water-binding in brine-enhanced meats. **Food Research International**, v. 38, n. 3, p. 281-287, 2005.

Trabalho a ser enviado para a revista *Journal of Food Protection*

Hygienic-sanitary quality and adulteration of hamburger meat

Microbiological analysis and quantification of soy protein using the isotope method ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) for commercial brands of beef hamburger

Ducatti, R.^{1*}; Pinto, J. P. A. N.¹; Sartori, M. M. P.²; Ducatti, C.³

¹Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ Estadual Paulista – UNESP. Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brazil. Postal Code 18.618-970

²Department of Rural Engineering, School of Agronomic Science, Univ Estadual Paulista – UNESP, Fazenda Lageado, Portaria I: Rua José Barbosa de Barros, nº 1780, Botucatu, SP, Brazil, Postal Code 18.610-307.

³Center of Stable Istopes, Institute of Biosciences, Univ Estadual Paulista – UNESP. Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brazil. Postal Code 18.618-970

KEY words: hamburger meat, microbiology, stable isotopes, adulteration

31 *Corresponding author: Rhani Ducatti. Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of
32 Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Univ Estadual Paulista, Caixa Postal 572, 18618-970,
33 Botucatu, São Paulo, Brazil. Telephone: +55-14-38151171 e-mail: rhaniducatti13@hotmail.com

34

ABSTRACT

Hamburger is a manufactured meat product and a potential carrier of toxin-producing bacteria resulting from the various processing stages, from origin to processing, storage, transport and distribution for consumption. Moreover, its composition requirements are susceptible to fraud through the overuse of protein extenders. These ingredients help to reduce the cost of producing a final product, and they maximize profits for fraudulent industries. In addition, monitoring by supervisory bodies is hampered by a lack of appropriate analytical methodologies. Within this context, it is necessary to evaluate the hygienic-sanitary aspects of hamburger meat through a microbiological analysis to determine and quantify the levels of added soy protein through the use of nitrogen-15 and carbon-13 stable isotopes. A total of 110 beef hamburger samples from 11 commercial brands were analyzed, and all 11 brands exhibited a bacterial count that was within the limits (5×10^3 CFU/g) for coliforms at 45°C; however, the value of coagulase-positive *Staphylococcus* in the H brand (samples 1 and 7) was above the permitted standards (5×10^3 CFU/g). The B (sample 5), D (sample 5), E (sample 5) and G (sample 4) brands also showed counts above the recommended levels (3×10^3 CFU/g) for sulfite-reducing *Clostridium* at 46°C, and the brand L (sample 6) was positive for *Salmonella* spp. Only three samples of the G brand were within the standards set by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply in the Normative Instruction (IN) No. 20 dated 07/31/2000. The remaining 97 samples from 10 commercial brands contained more than 4% soy protein; therefore, they are not in compliance with the current legislation.

Meat is one of the most highly consumed foods worldwide because it is a primary source of essential nutrients and provides proteins with high biological value. Beef is classified as a red meat, which has great nutritional importance because it provides the main nutrients required for balanced diets (35). Beef is an excellent source of high biological value proteins and is rich in essential fatty acids, B complex vitamins (thiamine, riboflavin, niacin, folic and pantothenic acids and vitamins B₆ and B₁₂), minerals (K, P, Mg, Fe and Zn) and essential amino acids (38).

Protein is the most important component of meat not only because of its concentration but also because of its nutritional value. Proteins of animal origin have a higher amino acid composition and, therefore, higher biological value than proteins of plant origin (32). Thus, meat has a significant biological value because it can provide high percentages of essential amino acids (7).

The industrialization of meat has led to the production of alternative products, such as less noble cuts, which has increased the profits of commercial slaughterhouses. Such diversification has included a large number of products that include meatballs, hamburger, nuggets, sausage, bologna and salami. Foods that require a shorter preparation time, are affordable and have a pleasant taste and good quality have received special attention (12).

Among such food items, products derived from beef are the most popular, and hamburger meat accounts for approximately 40% of these products (25).

In addition to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply's Normative Instruction (IN) No 20 dated 07/31/2000 (23), which stipulates the quality standards of hamburger meat, the resolution No 12/2001 from the National Health Surveillance Agency (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) also regulates and standardizes the microbiological parameters for the commercialization of these products.

Beef is one of the food products that is most frequently involved in food poisoning outbreaks because, in addition to being one of the most consumed items, it provides an excellent environment for the development of microorganisms, especially clostridia, staphylococci and enterobacteria (17, 16, 27).

Hamburgers and other cooked meat products are seen as vehicles in the outbreaks of foodborne toxinoses caused by *Staphylococcus aureus* (9) and *Clostridium perfringens* (11). These products are also associated with outbreaks of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and gastroenteritis caused by *Salmonella* spp., and they have contributed to an increased frequency of foodborne toxic infections worldwide (39). The risk becomes even greater when such products are consumed by children, the elderly and immunosuppressed individuals, who may suffer severe health damage, including death (24, 37).

Similar to other meat products, hamburger meat that is undercooked or improperly handled is an important source of contamination and can transmit of diseases, such as hemorrhagic colitis and gastroenteritis, and cause food poisoning outbreaks from bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens* (39).

For many consumers, there is an association between the quality of hamburger meat and its price, with more expensive products considered to have a higher quality and vice versa. However, the price-quality relationship is not always directly proportional, and more expensive products are often sold as if they were produced solely from prime cuts despite containing viscera, ligaments and non-meat protein, which is not specified or declared on the label.

Within this context, the present study aimed to assess the hygienic-sanitary quality of commercial brand beef hamburger meat and evaluate the quality of the products relative to the composition declared on the packaging, especially with regard to the presence of soy protein, with the goal of identifying compositions that may be harmful to the consumer and determining the integrity of the information provided.

In the meat industry, substances called binders, fillers, emulsifiers and stabilizers are used to increase the emulsion stability, cooking yield, cut and flavor characteristics and (primarily) reduce formulation costs (18).

In meat products, soy protein improves the texture and emulsifying capacity and enhances the appearance, firmness, juiciness, sliceability and cooking yield; in addition, soy protein reduces the formulation costs and replaces animal fat (10, 44). Extenders increase manufacturing yield because there they increase the weight of the final product compared with the original (26).

The ground beef used in hamburger may therefore be supplemented with hydrated soy protein, 1% salt, 0.2% monosodium glutamate and spices (28). However, according to the compositional requirements (23), only the "maximum addition of 4.0% of non-meat protein in aggregate form" is permitted.

Among soybean derivatives, textured soy protein has been the most widely used, and among plant products, it is considered the best replacement for animal-based products. Textured soy protein came into use because of the high cost of industrializing meat, coupled with the widespread availability of soybeans in countries such as the United States, where the texturization process was developed. The texturization of soy protein results in a product with a less intense flavor and texture that is appropriate for use in a variety of meat products (18).

Products such as hamburger contain a significant amount of substances that are used to increase yield, and soy products significantly decrease lipid oxidation and discoloration (42).

However, the ingestion of soy or other non-meat proteins by allergic individuals may present a health risk; therefore, its use must be controlled and accurate information must be provided on the label (21).

Food industry legislation has specified limits on the addition of non-meat ingredients to promote extension; however, it is difficult to detect and quantify these ingredients during inspections because there is a lack of appropriate analytical methods that can identify these ingredients (4).

Among the techniques that can be employed to evaluate the quality of hamburger, analyses of the natural variability of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) stable isotopes are noteworthy. This technique is used in to differentiate the production, certify the origin and manage fraudulent products with animal-based contents (34). The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values are related to eating habits, legality of industrial product labels, traceability of products and their geographical origin (40).

Mass spectrometry, which is used in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis, has been successfully employed for testing the authenticity and quality of products such as milk (6, 29, 30), cheese (8, 19), meat (3, 5), fish (14, 15, 41), honey, syrup, vinegar, ethanol, distillates, beer, brandy, oil, aromatic compounds, additives, etc. (43).

The $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ isotope ratio values have allowed the use of mass spectrometry to assess the presence of soy protein in beef hamburgers sold to consumers. However, there are no references in the literature on the use of stable isotope techniques to investigate these products, especially in investigations of fraud related to excess soy protein in Brazilian commercial brands.

The stable isotopes technique can be considered a tool for determining the authenticity of food products, particularly products for which conventional analytical methodologies may not provide completely reliable results (2).

The development of new and increasingly sophisticated technologies and methods for determining the authenticity of food products continues to accelerate because of the growing awareness among consumers of problems related to food security and authenticity. The use of isotope analysis methods has become a crucial weapon in the fight against the fraudulent incorporation of improper ingredients (13).

MATERIALS AND METHODS

To evaluate the hygienic-sanitary quality and isotopic profile of beef hamburgers, 11 commercial brands were analyzed and denominated as brands A, B, C, D, E, F, G, H, I, J and L, for a total of 110 samples.

Samples from the L brand were the 100% meat control, whereas the samples from the M brand were the 100% soy control. The control samples were not analyzed by microbiological methods.

All of the microbiological analyses (*Salmonella* spp. detection, coliform count at 45°C, coagulase-positive *Staphylococcus* count and sulfite-reducing *Clostridium* count at 46°C) were performed according to the methodology described in the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply's IN No. 62 dated 08/26/2003 (22).

To perform the isotopic analysis of the hamburger meat, 25-g samples were thawed and dried in a forced-air oven at 56°C for 48 hours. After this period, the hamburger samples were defatted and ground in a liquid nitrogen cryogenic mill at -196°C for 3 minutes at the maximum frequency to obtain a homogeneous, microscopic material of very fine particle size (particles <60 µM) (33).

The hamburgers were then ground, defatted, weighed and analyzed in a DELTA-S mass spectrometer coupled to an elemental analyzer to determine the isotopic composition of the products.

The results were expressed as values of $\delta^{13}\text{C}$ based on the *Peedee Belemnite* (PDB) standard, which has a 0.2‰ margin of error, and values of $\delta^{15}\text{N}$ relative to the atmospheric N_2 standard, which has a 0.3‰ margin of error and were calculated by the following equation:

$$\delta i (\text{sample, standard}) = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3$$

RESULTS AND DISCUSSION

Microbiological analyses All of the Brazilian commercial brands exhibited bacterial counts that were within the limit (5×10^3 CFU/g) defined by RDC No. 12 of 1/2/2001 for coliforms at 45°C. The low count of the thermotolerant coliforms of these food products can be considered relevant information with regards to the proper refrigeration, hygiene and sanitation practices that much be maintained during processing and storage of the analyzed hamburgers. The analysis of the presence of thermotolerant coliforms in food provides more reliable information on the sanitary conditions of products and indicates the possible presence of enteropathogens (1).

However, the H brand (samples 1 and 7) showed coagulase-positive *Staphylococcus* values that were above the permitted range and exceeded the value of 5×10^3 CFU/g established by the current legislation. Based on these results, it can be hypothesized that there was inadequate storage temperatures or unsatisfactory hygienic conditions of the equipment, contact surfaces or handlers when these food products were manufactured. *Staphylococcus aureus* usually originates from the hands and is found in nasal and oropharyngeal secretions (36).

Brands D (sample 5), E (sample 5) and G (sample 4) also exhibited counts above the stipulated levels (3×10^3 CFU/g) for sulfite-reducing *Clostridium* at 46°C; therefore, these samples are not suitable for consumption from a hygienic-sanitary standpoint. These results can be indicative of water contamination and improper refrigeration temperatures because of the sporogenic development of *Clostridium perfringens* and resistance of the spores. The importance of *Clostridium perfringens*, despite its moderate frequency in water (its natural habitat), is primarily a result of its higher resistance to toxic substances, which confers increased survival in polluted waters (31).

For *Salmonella* spp., the microbiological standard stipulated by Resolution 12 of ANVISA is complete absence of this microorganism in a 25-g sample; however, the result obtained in the meat control brand L (sample 6) did not meet this standard. Serotyping revealed the presence of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Infantis in the beef hamburger. *Salmonella* has been widely reported in cattle, which may carry this microorganism undetected to the slaughterhouses. Its presence in cattle at slaughter and the subsequent cross-contamination of the carcass presents a significant threat to food safety (20).

Therefore, these beef hamburger samples showed unsatisfactory bacteriological standards, suggesting insufficient hygienic conditions for adequate sanitary quality of the product. Thus, hamburgers can act as triggers of infections and cause poisoning through the action of these microorganisms, and they should be considered unfit for consumption because they represent a health risk to consumers.

Isotopic analysis: to determine the legality of commercial beef hamburgers, equations (1) and (2) were used to calculate the isotopic pair ($\delta^{13}\text{C} = -13.5\text{‰}$ and $\delta^{15}\text{N} = 5.58\text{‰}$) corresponding to the 4% (▲) addition of soy protein permitted by law (Figure 1).

$$\text{Product} = \text{Source } S_1 + \text{Source } S_2$$

$$\delta^{13}\text{C} = a \delta S_1 + b \delta S_2 \quad (1)$$

$$\delta^{15}\text{N} = a \delta' S_1 + b \delta' S_2 \quad (2)$$

where source S_1 = soy; Source S_2 = meat; Product = hamburger; δS_1 and δS_2 = relative isotopic enrichment of carbon from sources S_1 of C_3 carbon (soy) and sources S_2 of C_4 carbon (meat), respectively; $\delta' S_1$ and $\delta' S_2$ = relative isotopic enrichment of nitrogen from sources S_1 of C_3 nitrogen (soy) and sources S_2 of C_4 nitrogen (meat), respectively; $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ = relative isotopic enrichment of the product (hamburger) in carbon-13 and nitrogen-15, respectively.

Only the 10 control meat samples and 3 samples of the G brand were found to be below the 4% threshold for soy allowed by the IN. Figure 1 clearly shows the decrease in the $\delta^{13}\text{C}$ value of the hamburgers

with the increasing percentage of soy protein used in the formulations. Therefore, as companies add soy protein to their food products, the isotopic enrichment value of hamburgers tends to become closer to that of soy protein $\delta^{13}\text{C}$ (-26.02 ‰) and further from that of meat $\delta^{13}\text{C}$ (-12.99‰). The same trend occurred with the nitrogen values, with greater amounts of added soy protein added resulting in smaller $\delta^{15}\text{C}$ values, with the isotope values closer to -0.54‰ (100% soy) and farther from 5.84‰ (100% beef).

The stable isotopes technique certified that only three beef hamburger samples of the G brand showed values within the permitted range of added soy by the IN No 20 of 07/31/2000. The other 97 samples from 10 commercial brands showed more than 4% soy protein; therefore, they are in violation of the specific current national legislation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.- Fapesp Process Number 2011/23164-3 and to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes.

REFERENCES

1. American Public Health Association Committee on Microbiological for Foods. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C..
2. Bahar, B., Monahan, F. J., Moloney, A. P., O'Kiely, P., Scrimgeour, C. M., and Schmidt, O. 2005. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 19: 1937-4942.
3. Bahar, B., Schmidt, O., Moloney, A. P., Scrimgeour, C. M., Begley, I. S., and Monahan, F. J. 2008. Seasonal variation in the C, N and S stable isotope composition of retail organic and conventional Irish beef, *Food Chem.*, 106: 1299-1305.
4. Belloque, J., García, M. C., Torre, M., and Marina, M. L. 2002. Analysis of soybean proteins in meat products: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42: 507-532.
5. Boner, M., and Forstel, H. 2004. Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef, *Analyt. Bioanalyt. Chem.*, 378: 301-310.

- 236 6. Brescia, M. A., Monfreda, M., Buccolieri, A., and Carrino, C. 2005. Characterization of the
237 geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic
238 determinations. *Food Chem.*, 89: 139-147.
- 239 7. Bressan, M. C., Abreu, L. R., Lobato, V., and Perez, J. R. O. 1999. Introdução geral: os alimentos de
240 origem animal [General introduction: animal-based food]. *Textos Acadêmicos*. Lavras: UFLA.
- 241 8. Camin, F., Wietzerbin, K., Cortes, A. I. B., Haberhauer, G., Lee, M., and Versini, G. 2004. Application
242 of multi-element stable isotope ratio analysis to the characterization of French, Italian, and Spanish cheeses. *J.*
243 *Agr. Food Chem.*, 52: 6592-6601.
- 244 9. Carmo, L., Dias, R., Anunciação, L., and Bergdoll, M. S. 1995. Staphylococcal food poisoning in
245 Minas Gerais State, Brazil. *Arq. Bras. Med. Veterinár. Zootec.*, 47: 113-122.
- 246 10. Castro-Rubio, F., García, M. C., Rodríguez, R., and Marina, M. L. 2005. Simple and inexpensive
247 method for the reliable determination of soybean proteins in heat-processed meat products: an alternative to the
248 AOAC official method. *J. Agr. Food Chem.*, 53: 220-226.
- 249 11. Centers for Disease Control. 1993. Update: *Clostridium Perfringens* gastroenteritis associated with
250 corned beef served at St. Patrick's Day Meals – Ohio and Virginia, 1993. *MMWR*, 43: 137-138.
- 251 12. Costa, L. O. 2004. Processamento e diminuição do reprocesso do hambúrguer bovino (HBV)
252 [Processing and reduced reprocessing of beef hamburger (BH)]. Course Conclusion Report (Undergraduate
253 Program in Food Engineering) - Universidade Católica de Goiás, Goiânia.
- 254 13. Ferreira, A. 2008. Espectrometria de massa de razões isotópicas [Mass spectrometry of isotope ratios].
255 2008. Thesis (PhD in Analytical Chemistry) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- 256 14. Focken, U. 2004. Feeding fish with diets of different ratios of C3- and C4-plant-derived ingredients: a
257 laboratory analysis with implications for the back-calculation of diets from stable isotope. *Rapid Commun.*
258 *Mass Sp.*, 18: 2087-2092.

- 259 15. Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Muetzel, S., Abel, H., and Becker, K. 2004. Feeding level and
 260 individual metabolic rate affect $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in carp: implications for food web studies. *Oecologia*,
 261 138: 175-183.

- 262 16. Germano, P. M. L., and Germano, M. I. S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos [Hygiene and
 263 food safety surveillance]. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

- 264 17. Hobbs, B. C., and Roberts, D. 1999. Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos [Toxin
 265 infections and hygienic-sanitary control of food]. Varela, São Paulo.

- 266 18. Instituto De Tecnologia De Alimentos. 1981. II Curso Internacional Sobre Tecnologia da carne [2nd
 267 International Course on Meat Technology]. ITAL, Campinas.

- 268 19. Manca, G., Camin, F., Coloru, G. C., Del Caro, A., Depentori, D., and Franco, M. A. 2001.
 269 Characterization of the geographical origin of Pecorino sardo cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and
 270 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid ratios. *J. Agr. Food Chem.*, 49: 1404- 1409.

- 271 20. Mcevoy, J. M., Doherty, A. M., Sheridan, J. J., Blair, I. S., and Mcdowell, D. A. 2003. The prevalence
 272 of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. *J. Appl. Microbiol.*,
 273 94: 693-700.

- 274 21. Mellenthin, O., and Galensa, R. 1999. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and
 275 HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products. *J. Agr. Food Chem.*, 47: 594-602.

- 276 22. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2003. Métodos analíticos oficiais para análises
 277 microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água [Official analytical methods for
 278 microbiological analyses for the control of animal products and water]. Instrução Normativa [Normative
 279 Instruction] nº 62 from August 26 of 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.

- 280 23. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2000. Regulamento Técnico de Identidade e
 281 Qualidade de Hambúrguer [Technical Regulation of the Identity and Quality of Hamburgers]. Instrução
 282 Normativa [Normative Instruction] nº 20 de 31/07/2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil,
 283 Brasília, DF.

- 284 24. Morris, J. G. 1996. Current trends in human diseases associated with foods of animal origin. Public
285 Vet. Med., 15; 209 (12): 2045-7.
- 286 25. Nascimento, M. G. F., Oliveira, C. Z. F., and Nascimento, E. R. 2005. Hambúrguer: evolução
287 comercial e padrões microbiológicos [Hamburger: commercial developments and microbiological standards].
288 Boletim CWPPA, 23: 59-74.
- 289 26. Olivo, R. 2006. Tecnologia da Extensão Carne [Meat Extender Technology]. In M. Shimokomaki, R.
290 Olivo, N. N. Terra, B. D. G. M Franco (eds.), Atualidades em ciência e tecnologia de carnes [Current issues in
291 meat science and technology]. Livraria Varela, São Paulo.
- 292 27. Panetta, J. C. 1994. Prevalência e controle de enfermidades humanas transmitidas pela ingestão de
293 carne bovina [Prevalence and control of human diseases transmitted by ingesting beef]. Higiene Aliment., 8: 19-
294 20.
- 295 28. Pardi, M. C., Santos, I. F., Souza, E. R., and Pardi, H. S. 2001. Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne
296 [Meat Science, Hygiene and Technology], v. 1-2. UFG/EDUFF, Rio de Janeiro.
- 297 29. Renou, J. P., Deponge, C., Gachon, P., Bonnefoy, J. C., Coulon, B., Garel, J. P., Vérité, R., and Ritz, P.
298 2004. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear
299 magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. Food Chem., 86: 251-256.
- 300 30. Ritz, P., Gachon, P., Garel, J. P., Bonnefoy, J. C., Coulon, J. B., and Renou, J. P. 2005. Milk
301 characterization: effect of the breed. Food Chem., 91: 521-523.
- 302 31. Roitman, I., Travassos, L. R., and Azevedo, J. L. 1987. Tratado de Microbiologia [Microbiology
303 Treaty]. Editora Manole, São Paulo.
- 304 32. Roça, R. O. Composição química da carne [Chemical composition of beef]. Material didático.
305 Botucatu: Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal. Fazenda Experimental Lageado, F.C.A.,
306 Universidade Estadual Paulista. Available at:
307 <[http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5217/material_didatico/composicao_quimica da_carne.pdf](http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5217/material_didatico/composicao_quimica_da_carne.pdf)>. Accessed on
308 03/11/2014.

- 309 33. Rosa, C. R., Moraes, M., Gomes Neto, J. A., Nóbrega, J. A., and Nogueira, A. R. 2002. Effect of
310 modifiers on thermal behavior of Se in acid digestates and slurry of vegetables by graphite furnace atomic
311 absorption spectrometry. *Food Chem.*, 79: 517-523.
- 312 34. Rossmann, A. 2001. Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Rev. Int.*, 17: 347-
313 381.
- 314 35. Sarcinelli, M. F., Venturini, K. S., and Silva, L. C. 2007. Caracterização da carne bovina
315 [Characterization of beef]. *Boletim Técnico - PIE-UFES*: 00807.
- 316 36. Silva Junior, E. A., and Martins, E. A. 1991. Análise microbiológica em cozinhas industriais
317 [Microbiological analysis in industrial kitchens]. *Higiene Aliment.*, 5: 20–24.
- 318 37. Sockett, P. N. 1995. The epidemiology and costs of diseases of public health significance in relation to
319 meat and meat products. *J. Food Safety*, 15: 91-112.
- 320 38. Valle, E. R. 2000. Carne Bovina: alimento nobre indispensável [Beef: noble, indispensable food], n. 41.
321 Embrapa Gado de Corte, Campo Grande.
- 322 39. Tavares, T. M., and Serafini, A. B. 2003. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina
323 comercializados em sanduicherias tipo trailers em Goiânia (GO) [Microbiological evaluation of beef
324 hamburgers sold in trailer sandwich shops in Goiânia (GO)]. *Rev. Patol. Trop.*, 32: 45-52.
- 325 40. Thomas, F., Jamin, E., and Lees, M. 2005. Isotopic analysis of lipids as a means of authenticating fish
326 products. *Lipid Technol.*, 17: 204-208.
- 327 41. Trueman, C. N., McGill, R. A. R., and Guyard, P. H. 2005. The effect of growth rate on tissue diet
328 isotopic spacing in rapidly growing animals. An experimental study with Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Rapid*
329 *Commun. Mass Sp.*, 19: 3239-3247.
- 330 42. Varnam, A. H., and Sutherland, J. P. 1998. Carne y productos carnicos: tecnologia, quimica y
331 microbiologia [Meat and meat products: technology, chemistry and microbiology]. *Acribia*, Zaragoza.

332 43. Winkler, F. J., and Schmidt, H. L. 1980. Einsatzmöglichkeiten der ^{13}C isotonenmassenspektrometrie in
333 der lebensmitteluntersuchung. Eur. Food Res. Technol., 171: 85-94.

334 44. Xiong, Y. L. 2005. Role of myofibrillar proteins in water-binding in brine-enhanced meats. Food Res.
335 Int., 38: 281-287.

336

337

338

339

340

341 **FIGURE LEGENDS**

342 Figure 1. Standard curve based on the carbon and nitrogen isotope data from the meat and soy control samples
343 and analysis of the commercial hamburger samples.

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

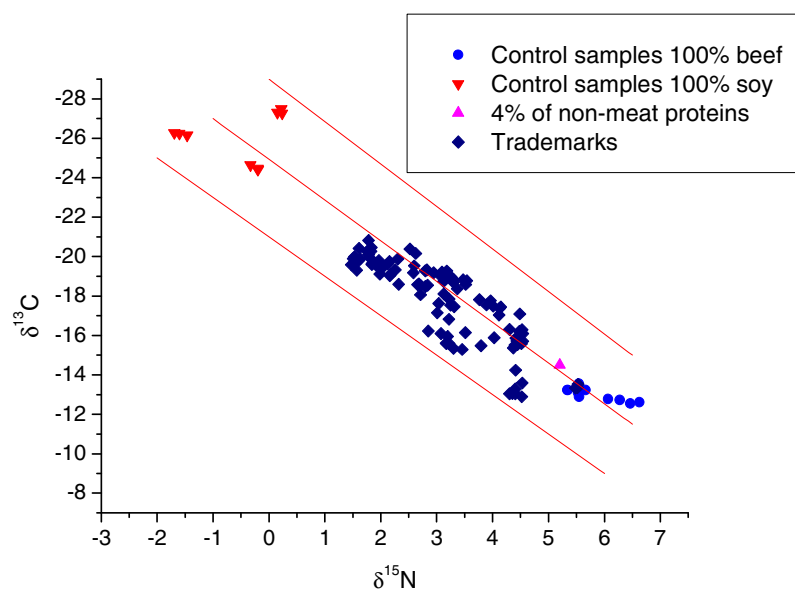
366

367

368

369

370



371

372

373

374

THIS SAMPLE IS FOR FORMATTING PURPOSES. IT IS BASED ON THE INSTRUCTIONS FOR AUTHORS. PLEASE REFER TO THE INSTRUCTIONS FOR COMPLETE DETAILS.

Running title

Title

Author^{1*}, Author² and Author¹

¹Institution and address

²Institution and address

Key words: Rotavirus, papaya, honey dew melon, pineapple, juices, survival studies

*Author for correspondence. Tel: (123) 456-7890; Fax: (123) 456-7789
E-mail: name@name.com

1 **ABSTRACT**

2
3 An abstract of no more than 2,000 characters, including spaces, must be placed on the second
4 page of the paper to summarize the principal points of the study. The abstract is a single
5 paragraph and does not contain references, figures, or tables. Abstracts are reprinted
6 separately by abstracting services and therefore must be meaningful without reference to the
7 body of the paper.

8

9

10

11

12

13

1 The introductory section has **no title** and begins on the page following the abstract. It
2 provides the reader with sufficient background information to justify the need for the study
3 and to evaluate the results of the research. An extensive review of the literature is not needed.
4 The introduction should conclude with a rationale for and objectives of the study that is being
5 reported. Reference citations in the text should be italicized (*1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11*).
6 All references cited in the manuscript must be included in the "Reference" section, numbered
7 in alphabetical order, and all references in the "Reference" section must be cited.

8 9 **MATERIALS AND METHODS**

10 Sufficient information must be provided so that another researcher, without the need for
11 additional input, can repeat the experiments that are described in the paper. If reference is
12 made to a method published elsewhere in a journal or document that may not be readily
13 available to most readers, then details of the method are to be included. If a published method
14 is modified, such modification(s) must be described. If the method is completely new, it
15 should be described in adequate detail for someone to be able to apply it. Sources (company,
16 city, state, and/or country) of unusual chemicals, bacterial strains, reagents, and equipment
17 must be identified, however the city, state and/or country of the supplier need only be
18 specified the first time the supplier is mentioned. "For states within the United States, use the
19 standard abbreviation (not the postal abbreviation) available at
20 <http://www.stateabbreviations.us/>." Delete registered trademarks when given with trade
21 names.

22 **Subheadings take the form of paragraph lead-ins.** Paragraph lead-ins should be
23 boldface, indented, and run in with the text, separated by a period. Third-order subheadings
24 are not accepted.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

RESULTS

The “Results” section provides information by means of text, tables, and figures; do not show the same data in both table and figure form. Use the “Results” section to refer to data in figures and/or tables, not to repeat the data in figures and tables. All tables and figures must be cited in the text. Tables and figures must be numbered in the order in which they are mentioned in the text. There is no need to specify where the tables or figures should be placed in the text. Tables and figures reporting results should not be cited in the Materials and Methods section. Table titles and figure legends should be detailed enough to make them self-standing. “Results and Discussion” may be combined, or there may be a separate “Discussion” section. A separate “Discussion” section is typically used for extensive interpretations of the results.

DISCUSSION

Do not extensively repeat the introduction or Results sections. Provide an interpretation of the results in relation to known information. Conclusions should be included in this section and not in a separate section.

ACKNOWLEDGEMENTS

Acknowledge financial and personal assistance (sources other than your institution or any potential conflict of interest).

1 **REFERENCES**

- 2 1. Anonymous. 2001. Real decree 3-484/2000 (12 January 2001) on the hygiene of ready-
3 to-eat foods. BOE no. 11. Boletín Oficial de Estado, Madrid, Spain.
- 4 2. Cabedo, L., J. N. Sofos, and G. C. Smith. 1996. Removal of bacteria from beef tissue by
5 spray washing after different times of exposure to fecal material. *J. Food Prot.*
6 12:1284–1287.
- 7 3. Doyle, M. P., L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.). 1997. Food microbiology:
8 fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington, D.C.
- 9 4. Food safety hazards for sprouted seeds. Docket no. 99D-4488. Available at:
10 <http://vm.cfsan.gov/~dms/sprougd1.html>. Accessed 17 July 1999.
- 11 5. Hussong, R. V., E. H. Marth, and D. G. Vakaleris. January 1964. Manufacture of
12 cottage cheese. U.S. patent 3,117,870.
- 13 6. Notaro, J. 13 June 1994. Banned in the USA [E-mail:jnotaro@ukans.edu]. Available
14 from: the author at Smith@odo.msoe.edu
- 15 7. Personal Communication. Sofos, J. N. 3 January 2001. Personal communication [E-
16 mail: jsofos@colostate.edu]
- 17 8. Pitt, J. I., and A. D. Hocking. 1997. Fungi and food spoilage. Blackie Academic and
18 Professional, London.
- 19 9. U.S. Food and Drug Administration. 1999. Guidance for industry: reducing microbial
20 food safety hazards for sprouted seeds. Docket no. 99D-4488. Available at
21 <http://vm.cfsan.gov/~dms/sprougd1.html>. Accessed 17 July 1999.

- 1 10. West, D. I., and L. B. Bullerman. 1992. Physical and chemical separation of mycotoxins
2 from agricultural products, p. 52–57. In J. E. Smith (ed.), *Mycotoxins and animal*
3 feeding stuffs, vol. 4. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 4 11. Yoon, H., J.-Y. Lee, H.-J. Suk, S. Lee, H. Lee, S. Lee, and Y. Yoon. 2012. Modeling to
5 predict growth/no growth boundaries and kinetic behavior of *Salmonella* on cutting
6 board surfaces. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-094.
- 7

1 **Figure legends**

2 FIGURE 1. Type figure legends double-spaced in a list on a page separate from the figures
3 but included in the manuscript text (not uploaded separately). Number each consecutively as
4 cited in the text.

5
6 FIGURE 2. Figures containing multiple components (e.g., 1A, 1B, 1C, etc.) should be placed
7 together on the same page with appropriate labels.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

Special Note Regarding Figures:

Figures should be placed on separate pages and no legend should be on the page with the figure; the only thing on the page with the figure should be the figure number, if known, in the upper right corner.

For production purposes **it is preferred that figures be submitted as separate figure files**. However, they may be imbedded at the end of the document, following the tables, during first submission.

Do not submit figures in color unless you intend to publish them in color. There is an additional cost to the author when publishing in color.

See Figure 1 on page 9 for an example of the correct formatting.

1 Table 1. Table titles should be complete enough so that the reader can understand the table
2 without necessarily referring back to the manuscript. The title should be included on the same
3 page as the table.

4
5
6
7

<u>Heading 1</u>	<u>Heading 2</u>	<u>Heading 3</u>
------------------	------------------	------------------

8
9

Figure 1

A



B



C



D

