



# Correlação estatística entre parâmetros microscópicos e microbiológicos em pimenta-do-reino moída (*Piper nigrum* L.) comercializada em Minas Gerais

## Statistical correlation between microscopic and microbiological parameters in ground black pepper (*Piper nigrum* L.) sold in Minas Gerais

RIALA6/1785

Flaviane Cristina Lopes MATOSINHOS<sup>1</sup>, Inês Helena Tristão de OLIVEIRA<sup>1</sup>, Juliane Rodrigues SILVA<sup>1</sup>, Gracielle Alves CARLOS<sup>2</sup>, Leandro Leão FAULA<sup>2</sup>, Marcos Paulo Gomes MOL<sup>3</sup>, Virgínia del Carmen Troncoso VALENZUELA<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Serviço de Microscopia de Produtos, Instituto Octávio Magalhães, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte, MG, Brasil, CEP: 30510-010. Tel: 31 3314 4681. E-mail: [virginia.delcarmen@funed.mg.gov.br](mailto:virginia.delcarmen@funed.mg.gov.br)

<sup>2</sup>Serviço de Microbiologia de Produtos, Instituto Octávio Magalhães, Fundação Ezequiel Dias

<sup>3</sup>Divisão de Ciência e Inovação, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias

Recebido: 01.11.2019 - Aceito para publicação: 23.04.2020

### RESUMO

A ausência de Boas Práticas de Fabricação durante a colheita, processamento e manuseio da pimenta-do-reino pode acarretar a contaminação do produto com sujidades microscópicas e microrganismos. Foram analisadas 227 amostras de pimenta-do-reino, comercializadas em Minas Gerais, coletadas entre 2008 e 2018, quanto à presença de fragmentos de pelo de roedor e de insetos, coliformes a 45°C ou *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Para verificar se havia correlação entre os contaminantes, foi empregado método estatístico de regressão linear múltipla. As análises microscópicas evidenciaram presença de fragmentos de pelo de roedor e de insetos em 26,0% e 30,5% das amostras, respectivamente, em valores superiores ao limite tolerado pela RDC 14/2014. Quanto às análises microbiológicas, 10% das amostras apresentaram coliformes a 45°C ou *E. coli* acima dos limites tolerados pela RDC 12/2001 e em 8,8% das amostras foi detectada presença de *Salmonella* spp. A avaliação estatística mostrou que houve correlação entre presença de fragmentos de insetos e de pelos de roedor e a contaminação por *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino. Os resultados demonstraram a importância das análises microscópica e microbiológica simultaneamente para detecção dos contaminantes presentes bem como das possíveis relações existentes entre eles e a melhor compreensão dos fatores que favorecem as contaminações.

**Palavras-chave.** controle de qualidade, *Salmonella*, microbiologia de alimentos, análise de alimentos, pelo de roedor, insetos.

### ABSTRACT

The absence of Good Manufacturing Practices during harvesting, processing and handling of black pepper can lead to contamination of the product with microscopic dirt and microorganisms. Two hundred and twenty seven black pepper samples, commercialized in Minas Gerais, collected between 2008 and 2018, were analyzed for the presence of rodent and insect fragments, coliforms at 45°C or *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. To verify whether there was a correlation between the contaminants, a statistical method of multiple linear regression was used. Microscopic analysis showed the presence of rodent and insect fragments in 26.0% and 30.5% of the samples, respectively, in values above the limit tolerated by RDC14/2014. As for the microbiological analysis, 10% of the samples presented coliforms at 45°C or *E.coli* above the limits tolerated by the RDC 12/2001 and in 8.8% of the samples *Salmonella* spp. were detected. The statistical evaluation showed that there was a relationship between the presence of insect fragments and rodent hair and contamination by *Salmonella* spp. in black pepper. The results demonstrated the importance of simultaneous microscopic and microbiological analysis to detect the contaminants present, as well as the possible relationships between them and better understanding of the factors that favor contamination.

**Keywords.** quality control, *Salmonella*, food microbiology, food analysis, rodent hair, insects.

## INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é originária da Índia e cultivada em várias regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo o Brasil um dos maiores produtores. É a mais importante especiaria comercializada mundialmente, sendo usada em larga escala como condimento em indústrias de carnes e conservas e na indústria cosmética e de aromas. Na indústria alimentícia, pode ser utilizada na forma de grãos inteiros, moídos, ou misturados com outros condimentos<sup>1</sup>.

A cadeia produtiva da pimenta-do-reino, bem como de outras especiarias, geralmente começa com pequenos produtores, que fazem a secagem do produto a céu aberto, deixando-o exposto à poeira, insetos, excretas de animais e outras sujidades, caso não sejam adotadas práticas de higiene. Depois de secas, as especiarias geralmente passam por múltiplas etapas de estocagem, processamento, empacotamento e re-empacotamento, que podem durar anos. Sendo assim, patógenos podem ser introduzidos em qualquer ponto ao longo da cadeia de produção e distribuição, se as Boas Práticas de Fabricação não forem seguidas<sup>2</sup>.

Além de análises microbiológicas para avaliação da qualidade de condimentos e especiarias, deve-se recorrer a testes macroscópicos, microscópicos, físicos e químicos, para a comprovação de eventuais adulterações<sup>3</sup>. Diferentes técnicas analíticas espectroscópicas, análises de espectrometria de massa, diversos tipos de cromatografia gasosa ou líquida e diferentes técnicas de análise de DNA têm sido empregadas na detecção de adulterações não intencionais e fraudes em ervas e especiarias<sup>4</sup>.

A presença de sujidades representa um impacto negativo para a qualidade do alimento, com diminuição do sabor e aroma do produto, associado a uma redução da sua vida de prateleira, bem como, à repercussão negativa da marca no mercado<sup>5,6</sup>. Ressalta-se que a pimenta-do-reino é muitas vezes utilizada diretamente sobre os alimentos prontos, sem nenhum processamento adicional que elimine os contaminantes presentes, sendo, portanto capaz de favorecer potencial risco de saúde ao consumidor<sup>7</sup>.

Até 2013, as análises macro e microscópica da pimenta-do-reino eram respaldadas pela Resolução RDC ANVISA/MS n° 175/2003<sup>8</sup>. Atualmente, estas são orientadas pela Resolução RDC ANVISA/MS n° 14/2014<sup>9</sup> que dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Já os parâmetros microbiológicos sanitários, para alimentos em geral, são contemplados pela Resolução RDC ANVISA/MS n° 12/2001<sup>10</sup>.

Considerando os riscos oferecidos pela utilização em larga escala de pimenta-do-reino contaminada por sujidades e microrganismos patogênicos, tanto na culinária familiar quanto na indústria alimentícia, esse trabalho teve por objetivo avaliar a série histórica de contaminação microscópica e microbiológica desse produto, de acordo com a legislação sanitária, bem como verificar a correlação entre os contaminantes detectados, a partir das análises de amostras comercializadas em Minas Gerais no período de 2008-2018.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das amostras

Por meio das ações da Vigilância Sanitária Estadual, 227 amostras de pimenta-do-reino em pó de 83 marcas diferentes, foram coletadas no varejo de municípios em Minas Gerais, entre os anos 2008 e 2018. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas à Fundação Ezequiel Dias (FUNED) para análises microscópica de sujidades leves e microbiológica (contagem de coliformes a 45°C ou *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.).

### Análises microscópicas e microbiológicas

Para a pesquisa de matérias estranhas microscópicas utilizou-se o método de flutuação n° 972.40A (AOAC, 2016)<sup>11</sup>. A determinação de coliformes a 45°C foi realizada por meio do método de Número Mais Provável (NMP), de acordo com APHA<sup>12</sup>. Alternativamente à contagem de coliformes a 45°C, utilizou-se a contagem de *Escherichia coli* pelos métodos rápidos Petrifilm® EC (AOAC, 2016)<sup>13</sup> e SimPlate® EC (AOAC, 2016)<sup>14</sup>. Para a pesquisa de *Salmonella* spp. empregou-se método de triagem ELFA (*Enzyme Linked*

Fluorescent Assay), no sistema automatizado VIDAS® (AOAC, 2016)<sup>15</sup> e método confirmatório tradicional (BAM, 2018)<sup>16</sup>.

#### Análises estatísticas

Utilizaram-se análises univariadas, por meio da seleção dos potenciais preditores, para explicar a ocorrência dos desfechos (presença de *Salmonella* e presença de coliformes). O nível de significância para seleção dos potenciais preditores foi de 25%. Na análise univariada para as variáveis categóricas foi utilizado o teste exato de Fisher e teste Qui-Quadrado<sup>17</sup>, enquanto que para as variáveis quantitativas foi utilizado o teste de Mann-Whitney<sup>18</sup>. Quando utilizado o teste exato de Fisher, os intervalos de confiança para as razões de chance foram ajustados para pequenas amostras<sup>19</sup>.

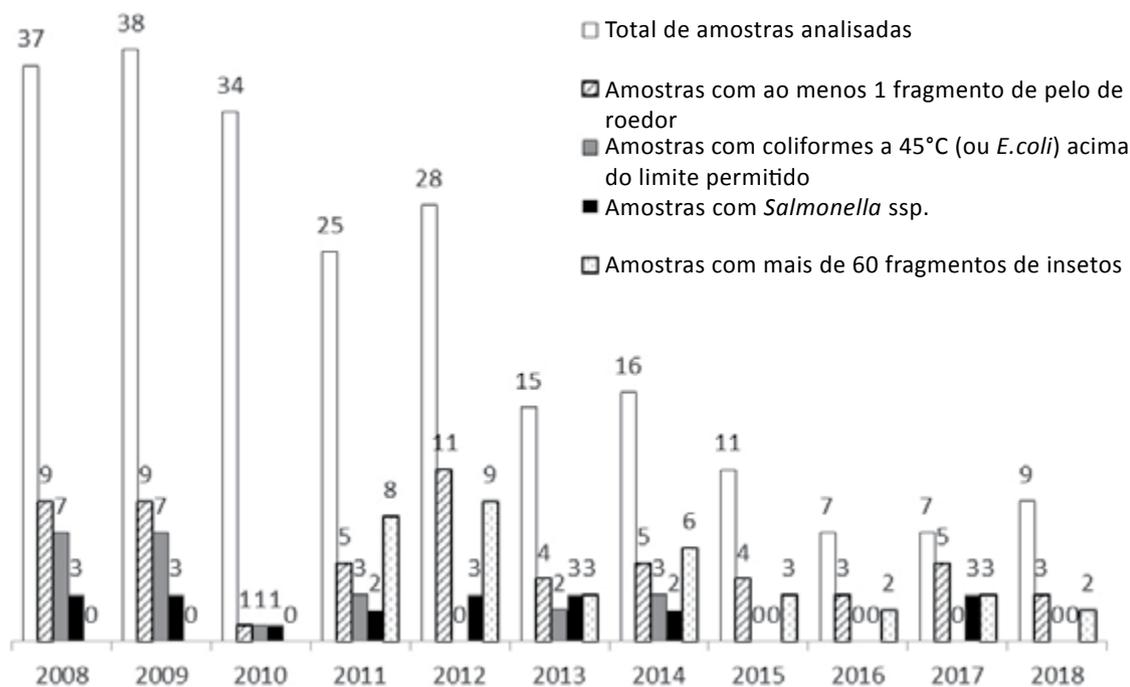
A partir da seleção realizada pelas análises univariadas foi ajustada uma regressão logística<sup>17</sup> com todas variáveis selecionadas, sendo aplicado, em seguida, o método Backward<sup>20</sup> e adotado um nível de 10% de significância. A qualidade do ajuste da regressão logística foi verificada por meio do teste de Hosmer-Lemeshow<sup>21</sup> e pseudo R<sup>2</sup> de Nagelkerke<sup>22</sup>. O software utilizado na análise foi o R versão 3.5.3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análises microscópicas e microbiológicas

A **Figura 1** apresenta a distribuição, por ano, do número de amostras de pimenta-do-reino analisadas no período de 2008 a 2018, contendo um ou mais fragmentos de pelo de roedor, mais de 60 fragmentos de insetos, coliformes a 45°C ou *E. coli* acima do limite tolerado, e presença de *Salmonella* spp. Vale ressaltar que no ano de 2016, foram realizadas análises microbiológicas apenas para detecção de coliformes a 45°C, todas com resultado satisfatório. De 2011 em diante, os resultados de fragmentos de insetos são apresentados de acordo com o limite máximo tolerado pela RDC ANVISA/MS 14/2014<sup>9</sup>, ou seja, presença de mais de 60 fragmentos de insetos.

Os dados revelam que, apesar da redução no número de amostras analisadas ao longo dos anos, de modo geral, houve um aumento na proporção de amostras em desacordo com os limites dos parâmetros microscópicos e microbiológicos avaliados, indicando que as condições higiênico-sanitárias permaneceram deficientes no processo produtivo.

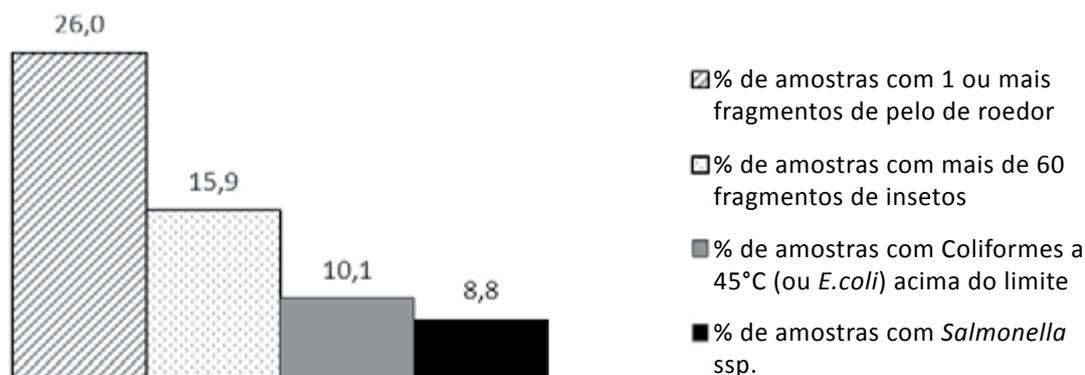


**Figura 1.** Distribuição das amostras de pimenta-do-reino analisadas no período de 2008 a 2018 de acordo com os parâmetros microscópicos e microbiológicos avaliados

Durante a vigência da RDC ANVISA/MS nº 175/03<sup>8</sup>, os anos de 2008, 2009 e 2012 foram aqueles com maiores prevalências de amostras contendo fragmentos de pelo de roedor, ressaltando que nesse período, a legislação preconizava a ausência de qualquer matéria estranha com risco à saúde no produto. A partir de 2014, quando passa-se a tolerar a presença de 1 fragmento de pelo de roedor em 50 g de pimenta-do-reino de acordo com a RDC ANVISA/MS nº 14/2014<sup>9</sup>, 65% das 20 amostras analisadas que apresentaram pelo de roedor continham apenas um fragmento sendo, portanto, consideradas satisfatórias. Embora, a nova resolução RDC ANVISA/MS 14/2014<sup>9</sup> tenha se tornado mais tolerante quanto aos critérios microscópicos, o que se observou em 2016 e 2017 foi a permanência de elevado percentual (28,6 %) de amostras reprovadas por conter mais de um pelo de roedor. A presença de fragmentos de pelo de roedor no alimento indica que houve contato com roedores, importantes vetores mecânicos de diversos patógenos causadores de doenças ao homem<sup>23</sup>. Santos et al<sup>24</sup> comprovaram essa associação, após a identificação concomitante de *Salmonella* spp. e pelo de roedor em amostras de pimenta-do-reino.

Quanto à presença de fragmentos de insetos, a RDC ANVISA/MS nº 14/2014<sup>9</sup> atualmente em vigor, estabelece um limite de 60 fragmentos de insetos em 50g de amostra de pimenta-do-reino. Anteriormente, durante a vigência da RDC ANVISA/MS 175/2003<sup>8</sup>, apenas amostras com fragmentos de insetos considerados de risco à saúde, como baratas e moscas, eram consideradas insatisfatórias. A partir de 2011, o laboratório passou a registrar a contagem de fragmentos de insetos nas amostras analisadas, todavia não se observou um aumento significativo no percentual de amostras reprovadas após esta modificação. Isso se deve ao fato de que só foram encontrados fragmentos de insetos próprios da cultura e em quantidade permitida e não foram encontrados fragmentos de insetos considerados de risco à saúde em todo o período.

A análise dos parâmetros microscópicos das 227 amostras de pimenta-do-reino demonstrou que 26% tinham um ou mais fragmentos de pelo de roedor e 15,9% continham mais de 60 fragmentos de insetos, valor limite estabelecido pela RDC ANVISA/MS nº 14/2014<sup>9</sup> para este contaminante (**Figura 2**).



**Figura 2.** Percentuais totais de amostras de pimenta-do-reino avaliadas de acordo com os parâmetros microscópicos e microbiológicos no período de 2008 a 2018 (exceto para amostras com mais de 60 fragmentos de insetos, cujo período foi de 2011 a 2018)

Fonte: Funed, Belo Horizonte-MG

Estudos realizados em amostras de pimenta-do-reino, entre outros condimentos, coletadas pelo FDA nos Estados Unidos num período de 3 anos mostraram um alto índice de contaminação por

matérias estranhas<sup>3</sup>. Estes autores verificaram que das 1.523 amostras de pimenta-do-reino analisadas, 98,4% estavam contaminadas com fragmentos de insetos e 20%, com pelos de roedor. Resultados

obtidos a partir de pimenta-do-reino coletada no estado de São Paulo revelaram que 98,5% das amostras analisadas continham fragmentos de insetos e 23,2% apresentaram pelos de roedor, além de outras sujidades<sup>25</sup>. A avaliação de 75 amostras de pimenta-do-reino coletadas em São José do Rio Preto evidenciou que 30,67% continham pelos de roedor e 92% apresentaram fragmentos de insetos, sendo que em 14 delas a quantidade detectada foi superior a 60 fragmentos<sup>24</sup>. Na avaliação das condições higiênicas da pimenta-do-reino em pó, coletadas na cidade de São Paulo, 100% das amostras analisadas apresentaram fragmentos de insetos<sup>26</sup>. No presente estudo foram encontrados fragmentos de pelo de roedor em 26% das amostras, valor bastante próximo aos encontrados por Graciano et al<sup>25</sup> (23,2%), Santos et al<sup>24</sup> (30,67%) e por Gecan et al<sup>3</sup> (20%). Quanto ao número de fragmentos de insetos, registrou-se 15,9% de amostras com mais de 60 fragmentos de insetos, sem considerar as amostras com qualquer número de fragmentos de insetos. Isso explica o baixo índice de fragmentos de insetos comparados com os estudos anteriores. Entretanto, 96% de todas as amostras analisadas nesse período (2008 a 2011) continham fragmentos de insetos, demonstrando que a frequência é elevada e constante no produto analisado neste trabalho e também pelos outros autores citados acima.

Diversos trabalhos relatam a presença de coliformes a 45°C e *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino. Estudo realizado por Santos et al<sup>24</sup>, na região de São José do Rio Preto (SP), no qual foram analisadas 75 amostras de pimenta-do-reino moída de 19 marcas diferentes, relatou a presença de *Salmonella* spp. e de coliformes a 45°C em 14,67% e 33,33% das amostras, respectivamente. Moreira et al<sup>27</sup> verificaram 18,2% das amostras analisadas de pimenta-do-reino contaminadas com *Salmonella* spp.; 36,3%, com coliformes e 60,6%, com bactérias mesófilas. Neto et al<sup>28</sup> relataram a presença de *Salmonella* spp. (10,5%) e coliformes a 45°C (18,4%) em amostras de pimenta-do-reino e Oliveira e Teshima<sup>29</sup> verificaram que 66,7% das amostras de pimenta-do-reino analisadas encontravam-se contaminadas por *Salmonella* spp. Silva et al<sup>30</sup> reportaram a presença deste patógeno em 57% das amostras de pimenta-

do-reino coletadas em uma feira tradicional de Campina Grande. Michelin et al<sup>31</sup> avaliaram a contaminação por enteropatógenos em pimenta-do-reino e detectaram a presença de coliformes a 45°C, com identificação de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. No presente estudo, evidenciou-se que 8,8% das amostras estavam contaminadas com *Salmonella* spp. e 10,1% continham coliformes a 45°C ou *E. coli* em níveis acima dos limites tolerados pela RDC ANVISA/MS n°12/2001<sup>10</sup> (**Figura 2**).

A detecção de *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino moída é um dado preocupante, já que esse patógeno é capaz de sobreviver em amostras desse produto por até um ano<sup>2</sup>. A porcentagem relativamente baixa de amostras contendo *Salmonella* spp. observada no presente estudo (8,8%) pode estar relacionada ao fato destas amostras terem sido coletadas diretamente no comércio e terem um prazo de validade muito extenso, de aproximadamente dois anos. De acordo com Germano<sup>32</sup> o tempo de estocagem pode interferir no nível de contaminação microbiana, como ficou demonstrado com amostras frescas de pó para *curry*, contendo  $5,4 \times 10^7$  bactérias/g que, após dois meses de estocagem em temperatura ambiente, apresentaram contagem de  $4,0 \times 10^5$  bactérias/g. A pimenta-do-reino, apesar de possuir óleos essenciais com conhecida ação antimicrobiana *in vitro*, apresenta alguns fatores que dificultariam esta ação direta, tais como baixa atividade de água, alta contaminação por bactérias Gram-negativas e capacidade de interferência do tempo de estocagem na contagem final de bactérias, após estocagem à temperatura ambiente<sup>33</sup>. Estes fatores podem explicar o isolamento de *Salmonella* spp., coliformes a 45°C ou *Escherichia coli* em amostras de pimenta-do-reino.

Tendo em vista a importância e a carência de trabalhos de pimenta-do-reino que tenham realizado as mesmas análises simultaneamente e em longos períodos, o presente estudo destaca-se pela avaliação da série histórica de monitoramento de 10 anos. Além disso, os resultados do mesmo corroboram com os encontrados nos estudos citados anteriormente<sup>24-28</sup>, evidenciando a importância do monitoramento da qualidade sanitária desse alimento, bem como indicando a necessidade de mudanças nas práticas agrícolas

e de beneficiamento da pimenta-do-reino para a obtenção de um produto de melhor qualidade, sem risco à saúde do consumidor.

#### Análise estatística

A análise de correlação, por meio da regressão logística, entre a presença de “pelos de roedor”, o “número de fragmentos de insetos” e a influência destes na presença de *Salmonella* spp. revelou uma associação positiva (Tabela). Observou-se que a cada unidade de pelo que se acrescenta, aumenta a chance de encontrar contaminação por *Salmonella* spp. em 1,148 vezes, enquanto que para cada unidade de número de fragmentos de insetos que se acrescenta, aumenta-se a chance de encontrar *Salmonella* spp. em 0,005 vezes. Pelo método de Backward, as variáveis “presença de coliformes” e “satisfatório para presença de insetos” foram eliminadas, nesta sequência, devido à baixa associação com o desfecho.

**Tabela.** Resultado da regressão logística apontando as relações das variáveis significativas.

	Estimado	Erro padrão	Valor z	Valor p
(Intercepto)	-3,088	0,585	-5,276	0,000
Presença de pelos	1,148	0,679	1,692	0,091
Número de insetos	0,005	0,004	1,254	0,210

Pseudo R<sup>2</sup> (Nagelkerke) = 10,43%; Valor-p (Hosmer Lemeshow) = 0,86

As variáveis “presença de pelos de roedor” e “número de insetos” foram capazes de explicar 10,43% da presença de *Salmonella* spp. nas amostras. Pelo teste de Hosmer-Lemeshow o modelo está adequado (valor-p > 0,05), portanto, os dados obtidos nesse estudo sugerem que a presença de pelo de roedor e fragmentos de insetos aumentam a probabilidade de se encontrar *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino. A presença de pelos de roedor em um alimento sugere contaminação fecal e uma fonte potencial de doenças como a leptospirose, salmonelose, pestes e viroses, entre outras<sup>23,34</sup>.

As análises estatísticas, juntamente com a técnica de regressão logística, demonstraram uma boa aplicabilidade para investigar relações entre indicadores de qualidade e alimento, sendo esta a maior contribuição do estudo. Estas são

comumente utilizadas em epidemiologia, quando são investigados determinantes do processo saúde-doença para mensurar as relações lineares entre duas ou mais variáveis<sup>35</sup>. Na avaliação de parâmetros de qualidade em alimentos essa metodologia foi utilizada no estudo de Aleixandre-Tudó et al<sup>36</sup>, que avaliaram a correlação da qualidade sensorial de vinhos com parâmetros de qualidade das uvas.

## CONCLUSÃO

As amostras de pimenta-do-reino moída apresentaram um alto índice de matérias estranhas consideradas de risco à saúde (fragmentos de pelo de roedor) e presença de contaminantes microbiológicos (*Salmonella* spp. e coliformes a 45°C acima do limite tolerado), representando potencial risco à saúde do consumidor. Quanto à presença de fragmentos de insetos, os resultados das análises mostraram possíveis falhas das Boas Práticas de Fabricação. A análise estatística dos contaminantes encontrados, diferencial do estudo, demonstrou uma correlação entre a presença de fragmentos de insetos e de pelos de roedor e a probabilidade de contaminação por *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino moída e alerta para a importância da análise simultânea dos resultados microbiológicos e microscópicos para uma melhor compreensão dos fatores que favorecem as contaminações. Os resultados deste trabalho confirmam a importância do monitoramento contínuo da pimenta-do-reino moída para garantir a oferta de um produto de melhor qualidade sanitária ao consumidor.

## REFERÊNCIAS

1. Duarte MLR, Poltronieri MC, Chu EY, Oliveira RF, Lemos OF, Benchimol RL et al. A cultura da pimenta-do-reino/Embrapa Amazônia Oriental. 2.ed. rev. Amp. Brasília(DF): Embrapa Informação Tecnológica; 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140722/1/PLANTAR-Pimernta-do-reino-2a-ed-3a-impresao-2013.pdf>
2. Keller SE, Van Doren JM, Grasso EM, Halik LA. Growth and survival of *Salmonella* in ground black pepper (*Piper nigrum*). *Food Microbiol.* 2013;34(1):182-8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.12.002>

3. Gecan SJ, Bandler R, Glaze LE, Atkinson JC. Microanalytical quality of ground and unground marjoram, sage and thyme, ground allspice, black pepper and paprika. *J Food Prot*. 1986;49(3):216-21. Disponível em: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-49.3.216>
4. Galvin-King P, Haughey SA, Elliot CT. Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection. *Food Control*. 2018;88:85-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.031>
5. Moy GG and Todd ECD. Foodborne diseases – Overview of chemical, physical, and other significant hazards. *In: Encyclopedia of Food Safety*, vol.1. Academic Press; 2014.p.243-252 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123786135/encyclopedia-of-food-safety>
6. Reinholds I, Bartkevics V, Silvis ICJ, Van Ruth SM, Esslinger S. Analytical techniques combined with chemometrics for authentication and determination of contaminants in condiments: A review. *J Food Compost Anal*. 2015;44:56-72. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.05.004>
7. Ristori CA, Pereira MAS, Gelli DS. Behavior of *Salmonella* Rubislaw on ground black pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Control*. 2007;18:268-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.015>
8. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 175 de 8 de julho de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 10 jul 2003. Seção 1(130):32. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0175\\_08\\_07\\_2003.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0175_08_07_2003.html)
9. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 31 março 2014. Seção 1(61):58. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0014\\_28\\_03\\_2014.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0014_28_03_2014.pdf)
10. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 10 jan 2001. Seção 1(7):45. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012\\_02\\_01\\_2001.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html)
11. AOAC Official Methods of Analysis. Extraneous Materials: Isolation N° 972.40 A (16.14.23). 20.ed.; 2016.
12. APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5.ed. Washington; 2015.
13. AOAC Official Methods of Analysis. Coliform and *Escherichia coli* counts in foods Chapter 17 N° 991.14, 20.ed.; 2016.
14. AOAC Official Method 2005.03 Detection and Confirmed Quantitation of Coliforms and *E.coli* in Foods, 20.ed.; 2016.
15. AOAC Official Method 2011.03. VIDAS® *Salmonella* (SLM) Easy Salmonella Method, 20.ed.; 2016.
16. Bacteriological Analytical Manual Online. Food and Drug Administration. Version: Chapter 5: *Salmonella*. 8.ed. Arlington: FDA; 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam-chapter-5-salmonella>
17. Agresti A. Categorical data analysis. 2.ed. New York: Wiley; 2002.
18. Hollander M e Wolfe DA. Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons; 1999.
19. Jewell NP. Statistics for Epidemiology. New York: Chapman & Hall /CRC; 2004.
20. Efron MA. Multiple regression analysis - Mathematical Methods for Digital Computers; Ralston A and Wilf HS (eds.). New York: Wiley; 1960.
21. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. New York: Wiley; 2000.
22. Nagelkerke NJD. A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika*. 1991; 78(3): 691-2. Disponível em: [https://www.cesarzamudio.com/uploads/1/7/9/1/17916581/nagelkerke\\_n.j.d.\\_1991\\_-\\_a\\_note\\_on\\_a\\_general\\_definition\\_of\\_the\\_coefficient\\_of\\_determination.pdf](https://www.cesarzamudio.com/uploads/1/7/9/1/17916581/nagelkerke_n.j.d._1991_-_a_note_on_a_general_definition_of_the_coefficient_of_determination.pdf)

23. Silva ERA, Martini MH. The presence of rodent hair in food: a risk of human health. Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection; 2006. Disponível em: <http://spiru.cgahr.ksu.edu/proj/iwcspp/pdf2/9/6216.pdf>
24. Santos CCM, Graciano RAS, Peresi JTM, Ribeiro AK, Carvalho IS, Quirino GK et al. Avaliação dos padrões de identidade e qualidade da pimenta-do-reino comercializada na região de São José do Rio Preto, SP. 5º Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos; 1999; Foz de Iguaçu: Hig Aliment. 1999;13(61):101-4. Disponível em: <http://higienealimentar.com.br/61-2/>
25. Graciano RAS, Atui MB, Dimov NM. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de cominho e pimenta do reino em pó comercializados em cidades do Estado de São Paulo, Brasil, mediante a presença de matérias estranhas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(3):204-8. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial65\\_3\\_completa/1090.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial65_3_completa/1090.pdf)
26. Atui MB, Castejon MJ, Yamashiro R, De Lucca T, Flinn PW. Condições higiênico-sanitárias da pimenta-do-reino em pó (*Piper nigrum* L.) com o emprego de duas diferentes técnicas para detecção de sujidades leves. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(1):96-101. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial68\\_1\\_completa/1195.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial68_1_completa/1195.pdf)
27. Moreira PL, Lourenção TB, Pinto JPAN, Rall VLM. Microbiological quality of spices marketed in the city of Botucatu, São Paulo, Brazil. *J Food Prot*. 2009;72(2):421-4. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.2.421>
28. Neto MCV, Vieira CA, Ferreira ACB, Silva MCC, Valenzuela VCT, Matosinhos FCL et al. Qualidade microbiológica e microscópica de amostras comerciais de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). *Gest Cienc Saude - Rev Fund Ezequiel Dias*. 2009;5(2):93-97.
29. Oliveira NEG, Teshima E. Avaliação de microrganismos patogênicos na pimenta-do-reino. V Congresso latino americano e XI Congresso brasileiro de higienistas de alimentos; abril de 2011; Salvador, BA.: Anais do V Congresso Latino Americano e XI Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos; 2011. p.1116 [resumo].
30. Silva JF, Melo BA, Leite DT, Cordeiro MFR, Pessoa EB, Barreto CF et al. Análise microbiológica de condimentos comercializados na feira central de Campina Grande – PB. *Agropecu Cient Semi-árido*. 2013;9(2):83-7. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/acsa/index.php/ACSA/article/view/370/pdf>
31. Michelin AF, Araújo, MJ, Kimura, RS, Bronharo TM. Contaminação por enteropatógenos em pimenta-do-reino moída. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2016; 26(U): 1-3. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial\\_26/26u\\_art-1.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_26/26u_art-1.pdf)
32. Germano PML e Germano MIS. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo (SP): Livraria Varela; 2003.
33. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review *Int J Food Microbiol*. 2004;94(3):223-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
34. Zimmerman ML, Friedman SL. Identification of rodent filth exhibits. *J Food Sci*. 2000;65(8):1391-4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10618.x>
35. Hair-Jr JF, Black WC, Babin BJ, Anderson RE, Tatham MRL. Análise multivariada de dados. 6.ed. Porto Alegre(RS): Bookman; 2009.
36. Aleixandre-Tudó JL, Alvarez I, García MJ, Lizama V, Aleixandre JL. Application of multivariate regression methods to predict sensory quality of red wines. *Czech J Food Sci*. 2015;33(3):217-27. <https://doi.org/10.17221/370/2014-CJFS>