

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN: 0073-9855 (impresso)
ISSN: 1983-3814 (on-line)
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 74 número 2, 2015



Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 74 número 2, 2015
Abril – Junho 2015

Publicação trimestral/ quarterly publication
Solicita-se permuta/Exchange desired

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Hélio Hehl Caiaffa Filho

Editores Assistentes

Neuza Kasumi Shirata Iso
Aurea Silveira da Cruz Garçon
Christiane Asturiano Ristori Costa
Gisele Letícia Alves
Iracema de Albuquerque Kimura
Jacqueline Tanury Macruz Peresi
Lucile Tiemi Abe Matsumoto
Márcia Liane Buzzo
Raquel dos Anjos Fazioli
Sérgio Dovidauskas
Virginia Bodelão Richini Pereira
Thales de Brito
Lílian Nunes Schiavon
Sylia Rehder

Editor Chefe

Pedro Luiz Silva Pinto

Editor Adjunto

Adriana Bugno

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Diagramação

Claudia Cristiane de Araujo

Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino-de-Araújo, São Paulo, Brasil.
Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA
Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.
Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.
Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.
Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.
Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.
Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.
Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.
Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.
Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.
Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.
Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.
John Gilbert, York, UK.
Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.
Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.
Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.
Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.
Paul W. Flinn, Kansas, EUA.
Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.
Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.
Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.
Thales de Brito, São Paulo, Brasil.
Vanessa Yardley, London, UK.
Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.
Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.
Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ
(Secretaria de Estado da Saúde)
São Paulo, SP – Brasil

1941
2015, 74(2)

ISSN 0073-9855 CDD₁₈ 614.07205

RIALA 6
ISSN 1983-3814 versão *on line*
ISSN 2176-3844 CD-ROM

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.

Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1072.

Os artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz são indexados por: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; Analytical Abstracts; Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; Food Science and Technology Abstracts; Index Medicus Latino-americano; LILACS, SP: Saúde Pública; Microbiology Abstracts; Sumários Correntes Brasileiros; Toxicology Abstracts; Tropical Diseases Bulletin; e Virology Abstracts.

Acesso on line / on line access. Texto integral / full text.

<http://www.ial.sp.gov.br/>

Portal de Revistas em Veterinária e Zootecnia

<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz>

Portal de Revistas Saúde SP

<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/>

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-000 São Paulo/ SP – Brasil

Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869

E-mail: rial@saude.sp.gov.br

Rev Inst Adolfo Lutz. 2015; 74 (2)

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 1641 Avaliação do teste de aglutinação microscópica utilizando-se como antígeno as leptospiras saprófitas para o diagnóstico da leptospirose humana**
Evaluation of the microscopic agglutination test using saprophytic leptospire for the diagnosis of human leptospirosis
Roberta Morozetti BLANCO, Ana Paula CASSIOLATO, Eliete Caló ROMERO90-96
- 1642 Hepatitis B monovalent vaccines produced by different manufacturers: comparative study on the quality of vaccine in period before and after the shelf life**
Vacinas de Hepatite B monovalente produzidas por diferentes fabricantes: estudo comparativo da qualidade das vacinas no período pré e após o prazo de validade
Renata Faria de CARVALHO, Simone Ferreira Teixeira BASTOS, Fernando FINGOLA, Kátia Christina LEANDRO, Catia Ines COSTA97-103
- 1643 Estudo da identidade histológica de subprodutos de soja (*Glycine max* L.)**
Study on the histological identity of soy products (*Glycine max* L.)
Elaine Cristina de MATTOS, Márcia Bittar ATUI, Augusta Mendes da SILVA, Antônio Roberto FERREIRA, Márcia Dimov NOGUEIRA, Juliane dos Santos SOARES, Maria Aparecida Moraes MARCIANO104-110
- 1644 Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de geleias de umbu-cajá elaboradas com e sem a adição de sacarose**
Physical-chemical, microbiological and sensory characterization of jams made from *umbu-caja* prepared with and without the sucrose addition
Emanuel Neto Alves de OLIVEIRA, Dyego da Costa SANTOS, Ana Paula Trindade ROCHA, Josivanda Palmeira GOMES, Jorge Jacó Alves MARTINS, Joabis Nobre MARTINS111-121
- 1645 Propriedades sensoriais e físico-químicas de patê de frango com teor reduzido de sal**
Sensory and physical-chemical properties of chicken pate with reduced salt content
Flávia Renata GELINSKI, Bruna Magusso RODRIGUES, Lais Maluf HOKAMA, Elisvânia Freitas dos SANTOS, Camila Jordão CANDIDO, Daiana NOVELLO122-133
- 1646 Formação de biofilmes de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga sorotipos O153:H25, O113:H21 e O111:H8 em superfície de aço inoxidável e eficácia de sanitizante**
Biofilm formation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 and O111:H8 on the stainless steel surface and the effectiveness of sanitizer
Paulo Gomes de LIMA, Julia do Prado Lima Guimarães CABRAL, Thalita Martins da SILVA, Luciana Maria Ramires ESPER, Alice Gonçalves Martins GONZALEZ, Robson Maia FRANCO134-139

■ COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION

- 1647 Implantação e avaliação das Boas Práticas de Fabricação – BPF: estudo de caso**
Establishing and evaluating the Good Manufacturing Practices – GMP: a case study
Marcia Regina SINHORINI, Lindomar Subtil de OLIVEIRA, Alexandre da Trindade ALFARO.....140-144
- 1648 Melhoria do gerenciamento de resíduos de saúde para laboratórios: a experiência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ**
Proposal for improving the health-care waste management for laboratories
Anna Christina Rosa GUIMARÃES, Karen FRIEDRICH, Isabella Fernandes DELGADO145-150
- 1649 *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos**
Vibrio parahaemolyticus isolated from fishes captured from the Lagoa dos Patos estuary
Camile MILAN, Débora Rodrigues SILVEIRA, Janaina Viana da ROSA, Cláudio Dias TIMM151-155
- 1650 Qualidade microbiológica de sanduíches de estabelecimentos com serviço tipo *delivery***
Microbiological quality of sandwiches of food establishments with delivery service
Franciele Aparecida SANTANA, Michele Cristina VIEIRA, Uelinton Manoel PINTO156-161
- 1651 Avaliação das Boas Práticas de Manipulação no fluxograma operacional de preparações cárneas servidas em uma unidade de alimentação e nutrição**
Evaluation of Good Manufacturing Practices in an operational flow chart of meat preparations served in a food and nutrition unit
Bruna Garcia Alves FILGUEIRAS, Adriana Hocayen de PAULA, Wagner Miranda BARBOSA, Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ, Erika Madeira Moreira da SILVA162-168
- INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....169-177

Avaliação do teste de aglutinação microscópica utilizando-se como antígeno leptospiras saprófitas para o diagnóstico da leptospirose humana

Evaluation of microscopic agglutination test using saprophytic leptospire for diagnosis of human leptospirosis

RIALA6/1641

Roberta Morozetti BLANCO*, Ana Paula CASSIOLATO, Eliete Caló ROMERO

*Endereço para correspondência: Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, 9º andar, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068-2897. E-mail: rmorozetti@yahoo.com.br

Recebido: 17.11.2014 - Aceito para publicação: 28.04.2015

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de efetuar o diagnóstico precoce do teste de aglutinação microscópica (MAT) utilizando-se como antígeno leptospiras saprófitas sorovar Patoc (MAT-Patoc). Neste contexto, os resultados obtidos em amostras de soro de casos confirmados de leptospirose foram comparados com aqueles obtidos no teste ELISA IgM. Cento e cinquenta e oito amostras colhidas na fase aguda da doença foram analisadas pelo MAT-Patoc. Os soros com títulos ≥ 50 foram considerados reagentes. A sensibilidade do MAT-Patoc e do ELISA-IgM foi de 13,29 % e 28,48 %, respectivamente. Nos sete primeiros dias da doença, o MAT-Patoc foi capaz de detectar 12,29 % dos casos, enquanto o ELISA-IgM detectou 24,59 %. O MAT-Patoc foi reagente em amostras de casos cujos prováveis sorogrupos infectantes foram Icterohaemorrhagiae, Cynopteri e Ballum. Em conclusão, a utilização do teste MAT-Patoc apresentou menor sensibilidade no diagnóstico quando comparado ao ELISA-IgM, embora tenha sido reagente em algumas amostras com resultado não reagente. O MAT-Patoc deve ser utilizado em combinação com ELISA-IgM para melhorar a sensibilidade do diagnóstico de leptospirose na primeira fase da doença, com subsequente confirmação pelo MAT de referência.

Palavras-chave. leptospirose, ELISA-IgM, MAT, sorovar Patoc.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the early detection of antibodies by the microscopic agglutination test (MAT) using saprophytic leptospira serovar Patoc (MAT-Patoc), in serum samples from patients with confirmed leptospirosis. The obtained results were compared with those found in ELISA-IgM. A hundred fifty-eight serum samples collected from patients in acute phase of illness were analysed by MAT-Patoc. Samples with titers ≥ 50 were considered positive. The sensitivity of MAT-Patoc and IgM-ELISA was 13.29 % and 28.48 %, respectively. In the first seven days of the disease, MAT-Patoc was positive in 12.29 % of the cases, while the IgM-ELISA was positive in 24.59 %. The MAT-Patoc was positive in sera from confirmed cases, and the infecting serogroups were Icterohaemorrhagiae, Cynopteri and Ballum. In conclusion, the use of MAT-Patoc test showed lower sensitivity for diagnosing leptospirosis when compared with ELISA-IgM, although positive reactivity was found in some samples with negative results. The MAT-Patoc should be used in combination with ELISA-IgM to improve the sensitivity of the diagnosis of leptospirosis in the first phase of the disease, with subsequent confirmation by standard MAT.

Keywords. leptospirosis, ELISA-IgM, MAT, serovar Patoc.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* spp. A doença, em humanos, pode manifestar-se de várias formas, desde quadros assintomáticos até formas severas e potencialmente fatais^{1,2}. A forma grave da doença ocorre em apenas 5 a 10 % dos indivíduos infectados, porém, a maioria dos casos tem apresentação clínica inespecífica, frequentemente confundida com outras doenças febris, tais como dengue e febre amarela^{1,3}. Assim, testes diagnósticos que detectem a doença precocemente são necessários para auxiliar na identificação de casos clínicos. A cultura para leptospirose consiste em isolar leptospirosas diretamente do sangue e/ou do líquido cefalorraquidiano (LCR) colhidos na primeira semana de sintomatologia e semeados em meios de cultura específicos. Porém, devido ao crescimento lento das leptospirosas, o resultado pode demorar até quatro meses. Além disso, a cultura possui baixa sensibilidade diagnóstica devido ao período crítico de coleta e da presença de contaminantes que acabam inibindo o crescimento de leptospirosas^{1,3-5}.

Vários testes moleculares, tais como reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real, têm sido desenvolvidos para a detecção precoce de leptospirosas⁶⁻⁹. Porém, como há dificuldades referentes à suspeita de caso no início da doença e a sensibilidade da PCR diminui à medida que o paciente evolui para as fases tardias da leptospirose, os testes sorológicos são os métodos de escolha, sendo os mais comumente utilizados o teste de ELISA-IgM e o teste de aglutinação microscópica (MAT)^{10,11}.

O teste ELISA-IgM é um método de triagem, gênero-específico, que detecta anticorpos mais precocemente que o MAT, a partir do sexto dia após o início dos sintomas¹². O MAT é um método considerado como padrão-ouro recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que fornece o provável sorogrupo infectante e utiliza leptospirosas vivas, potencialmente patogênicas, para a realização do teste, oferecendo risco ao operador e necessitando de técnicos especializados e treinados para proceder à leitura em microscopia de campo escuro^{3,13}. Técnicas alternativas têm sido

estudadas a fim de oferecer maior rapidez, segurança e precocidade para o diagnóstico laboratorial da leptospirose¹⁴⁻¹⁹. Estudos demonstraram que cepas de leptospirosas saprófitas podem aglutinar com soros contendo anticorpos contra leptospirosas patogênicas, sendo o sorovar Patoc o mais utilizado em testes para o diagnóstico da leptospirose humana²⁰⁻²⁴. O objetivo desse trabalho foi avaliar a precocidade do MAT utilizando leptospirosas saprófitas pertencentes ao sorovar Patoc (MAT-Patoc), comparando com resultados obtidos pelo teste ELISA-IgM, em amostras de soro de casos de leptospirose, previamente confirmados pelo MAT de referência, colhidos na fase aguda da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras clínicas

Foram utilizadas amostras de soro colhidas na fase aguda da doença de 158 casos de leptospirose confirmados pelo MAT, recebidas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) Central, no período de janeiro de 2004 a abril de 2011, e estocadas a -20 °C.

Os dados dos pacientes, tais como as datas de coleta do material e aparição de primeiros sintomas, foram obtidos a partir de informações presentes nas fichas de notificação.

MAT

O MAT utilizado na confirmação dos casos, foi realizado segundo Faine et al³ utilizando sorovares representantes dos principais sorogrupos de leptospirosas circulantes em São Paulo, Brasil: Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Hardjo, Sejroe, Pyrogenes, Tarassovi e Wolfii. Todas as cepas foram mantidas em meio de cultura líquido Elinghausen McCullough Johnson Harris - EMJH (Difco, Sparks, MD, USA), com repiques semanais e incubação de 28-30 °C.

Os casos foram considerados confirmados quando apresentaram soroconversão, ou seja, primeira amostra negativa e segunda amostra com título ≥ 200 , em amostras pareadas de soro, sendo uma coletada na fase aguda e a outra na

fase de convalescença. O provável sorogrupo infectante foi o que apresentou o maior título e quando dois ou mais sorogrupos apresentaram o maior título, foi considerado inconclusivo.

MAT-Patoc

O MAT-Patoc foi realizado utilizando como antígeno *Leptospira biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc 1.

Foram utilizados controles positivo e negativo. Os soros foram triados e quando reagentes, foram titulados em diluições seriadas de razão 2. O título foi determinado pela reação onde houve aglutinação de pelo menos 50 % das leptospirosas em comparação ao controle negativo.

Leptospira biflexa sorovar Patoc cepa Patoc 1 foi mantida em meio de cultura líquido Elinghausen McCullough Johnson Harris - EMJH (Difco, Sparks, MD, USA), com repiques semanais e incubação de 28-30 °C.

O MAT-Patoc foi considerado reagente quando apresentou título ≥ 50 .

ELISA-IgM

O teste Elisa-IgM foi realizado conforme instruções do fabricante (Panbio Pty Ltd, Austrália). Os resultados foram considerados reagentes, não reagentes e inconclusivos segundo cálculo do *cut off* fornecido pelo *kit* e pelos valores de absorvância de cada amostra de soro.

Resumidamente, adicionou-se 100 μ L de amostras de soro, controles positivo e negativo e calibrador de *cut off*, diluídos a 1:100 em diluente de amostra, em placa de ELISA com 96 micropoços revestidos com leptospirosas. A placa foi incubada durante 30 min a 37 °C.

Após lavagem com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05 % de Tween 20, adicionou-se 100 μ L de anticorpo anti-IgM humano conjugado com peroxidase e incubou-se durante mais 30 min a 37 °C. Após lavagem, adicionou-se 100 μ L de substrato de tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio (cromógeno TMB) e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 min. A reação foi interrompida com 100 μ L de ácido fosfórico 1 M. A absorvância de cada poço foi medida a um comprimento de onda de 450 nm.

RESULTADOS

De 158 amostras de soro colhidas na fase aguda da doença, 21 e 45 apresentaram resultados reagentes nos testes de MAT-Patoc e ELISA-IgM, respectivamente. A sensibilidade dos testes comparada ao método de referência MAT foi de 13,29 % para o teste de MAT-Patoc e de 28,48 % para ELISA-IgM.

De 99 amostras que apresentaram resultado não reagente no ELISA-IgM, 12 apresentaram resultado reagente no MAT-Patoc; 14 amostras que apresentaram resultado inconclusivo no ELISA-IgM, apresentaram resultado não-reagente no MAT-Patoc. A comparação entre os resultados dos testes MAT-Patoc e ELISA-IgM está descrita na Tabela 1.

Dos 158 casos de leptospirose analisados, os prováveis sorogrupos infectantes foram Icterohaemorrhagiae (50,0 %), Cynopteri (6,3 %), Autumnalis (5,0 %), Sejroe (3,1 %), Hebdomadis (3,1 %), Canicola (1,8 %), Pyrogenes (1,8 %), Australis (1,8 %), Ballum (1,2 %), Grippotyphosa (0,6 %), Tarassovi (0,6 %), Celledoni (0,6 %) e Djasiman (0,6 %).

Tabela 1. Comparação dos resultados dos testes MAT-Patoc e ELISA-IgM em 158 amostras colhidas na fase aguda de casos confirmados de leptospirose

ELISA IgM	MAT-Patoc		Total
	Reagente	Não reagente	
Reagente	9	36	45
Inconclusivo	0	14	14
Não reagente	12	87	99
Total	21	137	158

Em 22,7 % dos casos não foi possível determinar o provável sorogrupo infectante, sendo considerados inconclusivos.

As 21 amostras que apresentaram resultado reagente no MAT-Patoc eram de casos que tinham como provável sorogrupo infectante *Icterohaemorrhagiae* (57,1 %), *Cynopteri* (4,7 %) e *Ballum* (4,7 %), além de 33 % cuja determinação do sorogrupo foi inconclusiva. De acordo com as informações encontradas nas fichas de notificação, 122 amostras foram coletadas do 1º ao 7º dia de doença. Dessas, 15 (12,29 %) apresentaram resultado reagente no MAT-Patoc e 30 (24,59 %) apresentaram resultado reagente no ELISA IgM (Tabela 2).

Das amostras reagentes no MAT-Patoc, 15 amostras apresentaram título de 50, cinco amostras título de 100 e uma amostra título de 200.

DISCUSSÃO

A leptospirose é considerada uma zoonose emergente, devido ao aumento da incidência e a ocorrência de epidemias em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento^{25,26}.

O diagnóstico precoce da leptospirose é de extrema importância, já que os sintomas podem ser confundidos com o de outras doenças febris. Além disso, acredita-se que o tratamento no período inicial da doença possa beneficiar o paciente evitando a evolução para a forma grave da doença. O diagnóstico laboratorial é baseado principalmente em técnicas sorológicas como ELISA-IgM, teste gênero específico utilizado em amostras colhidas na fase aguda da doença e o

MAT, teste padrão ouro que proporciona resposta a partir da primeira semana da doença. O MAT é o teste utilizado para confirmar os casos de leptospirose e fornece o provável sorogrupo infectante por utilizar um painel de sorovares representantes dos principais sorogrupos circulantes.

Apesar de vários testes moleculares, tais como PCR e PCR em tempo real, terem sido desenvolvidos para o diagnóstico precoce da leptospirose, alguns materiais clínicos como soros não são ideais para serem utilizados nessas técnicas^{10,27}. Esses métodos são restritos a poucos laboratórios devido aos altos custos e à complexa infra-estrutura necessária. Além disso, a sensibilidade diminui à medida que o paciente evolui para fases tardias da doença, período em que geralmente o paciente procura atendimento e ocorre a suspeita da leptospirose^{10,11}.

O uso de leptospirosas saprófitas em testes sorológicos para o diagnóstico da leptospirose tem a vantagem de não oferecer risco ao operador. A demonstração de que o sorovar saprófita Patoc era capaz de reagir com anticorpos contra leptospirosas patogênicas fez com que esta cepa fosse amplamente utilizada em testes diagnósticos para leptospirose humana^{22,28-30}. No presente estudo, o MAT-Patoc foi reagente em amostras de casos cujos prováveis sorogrupos infectantes foram *Icterohaemorrhagiae*, *Cynopteri* e *Ballum*. Assim, o MAT-Patoc pode ser utilizado na triagem de casos de leptospirose já que reage com diferentes sorovares, principalmente os pertencentes ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* que é o mais prevalente em nosso meio³¹⁻³³.

Tabela 2. Positividade dos testes MAT-Patoc e ELISA-IgM de acordo com o número de dias após o início dos sintomas

Dias após o início dos sintomas	Nº de amostras	Positividade	
		MAT-Patoc (%)	ELISA IgM (%)
1-7	122	15 (12,29)	30 (24,59)
8-14	32	6 (18,75)	14 (43,75)
15-22	3	0 (0)	1 (33,30)
≥23	1	0 (0)	0 (0)
Total	158	21 (13,29)	45 (28,48)

De acordo com Levett¹, os anticorpos IgM tornam-se detectáveis durante a primeira semana da doença, porém ainda em concentrações relativamente baixas. Apesar do ELISA-IgM ter apresentado sensibilidade maior que o MAT-Patoc, a positividade de ambos os testes foi baixa, provavelmente pelo fato de os anticorpos não estarem presentes em quantidades suficientes para a detecção por essas metodologias na fase aguda da doença.

Sehgal et al³⁴ reportaram uma sensibilidade do MAT de 41 % nas amostras coletadas durante a primeira semana de doença aumentando para 82 % nas amostras coletadas entre a segunda e a quarta semana e 96 % após a quarta semana de doença. Os autores também observaram que algumas amostras negativas para o MAT, coletadas até a quarta semana de doença, tornaram-se positivas em outra amostra obtida após 30 dias do início dos sintomas, confirmando a necessidade de pelo menos duas amostras pareadas de soro para o diagnóstico correto da leptospirose.

No presente estudo, o teste de MAT-Patoc apresentou menor sensibilidade em relação ao ELISA-IgM, com valores de 13,29 % e 28,48 %, respectivamente. Quando amostras com coleta até o 7º dia após o início dos sintomas foram analisadas, a positividade do MAT-Patoc também foi inferior ao do teste de ELISA-IgM sendo de 12,29 % e 24,59 %, respectivamente. Entretanto, por apresentar alguns resultados reagentes, inclusive com ELISA-IgM não reagentes, o MAT-Patoc pode auxiliar na detecção precoce da doença, aumentando ainda mais as chances de detecção se utilizado junto com o teste de ELISA-IgM.

Quando o teste de MAT é realizado em uma única amostra de paciente com suspeita de leptospirose e não há possibilidade de coleta de mais amostras, um título ≥ 800 confirma o diagnóstico¹. Os títulos apresentados pelo MAT-Patoc foram baixos, variando de 50 a 200, não sendo possível a confirmação por esse teste de nenhum dos casos deste estudo utilizando apenas uma amostra.

Em conclusão, para o diagnóstico precoce da leptospirose, o teste MAT-Patoc apresentou resultados reagentes em amostras colhidas na fase aguda da doença, inclusive em amostras com resultado não reagente no teste de ELISA IgM, apesar de ter sido menos sensível do que este. Esses resultados evidenciam a necessidade de mais de um teste de triagem. É importante ressaltar que o MAT, método de referência recomendado pela OMS, deve ser utilizado para confirmação de diagnóstico.

REFERÊNCIAS

1. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296-326. [DOI: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001].
2. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:757-71. [DOI: 10.1016/S1473-3099(03)00830-2].
3. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2ª ed. Melbourne (Australia): MediSci; 1999.
4. Adler B, Faine S, Christopher WL, Chappel RJ. Development of an improved selective medium for isolation of leptospires from clinical material. *Vet Microbiol*. 1986;12:377-81. [DOI: 10.1016/0378-1135(86)90087-8].
5. Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, Smythe LD, Symonds ML, Dohnt MF et al. Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2007;45(4):1363-5. [DOI: 10.1128/JCM.02430-06].
6. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwal AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*. 2005;54:45-9.
7. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS One*. 2009;4(9):e7093. [DOI: 10.1371/journal.pone.0007093].

8. Bedir O, Kilic A, Atabek E, Kuskucu AM, Turhan V, Basustaoglu AC. Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. by Multiplex Real-Time PCR (TaqMan) assay. *Pol J Microbiol*.2010;59(3):167-73.
9. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol*.2011;49(6):2154-60. [DOI: 10.1128/JCM.02452-10].
10. Blanco RM, Romero EC. Evaluation of nested polymerase chain reaction for the early detection of *Leptospira* spp. DNA in serum samples from patients with leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*.2014;78(4):343-6. [DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.009].
11. Ministério da Saúde do Brasil. Portal da Saúde. 2015. [acesso 2015 Mar 16]. Disponível em: [http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas].
12. World Health Organization/International Leptospirosis Society. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. [acesso 2014 Out 10]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf].
13. Marta AG. Leptospirosis: Public health perspectives. *Biologicals*.2013;41:295-7. [DOI: 10.1016/j.biologicals.2013.06.010].
14. Smits HL, Ananyina YV, Chereshsky A, Dancel L, Lai-A-Fat RFM, Chee HD, et al. International Multicenter Evaluation of the clinical utility of a Dipstick Assay for detection of *Leptospira*-Specific Immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. *J Clin Microbiol*.1999;37:2904-9.
15. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3303-10. [DOI: 10.1128/JCM.39.9.3303-3310.2001].
16. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):803-9. [DOI: 10.1128/JCM.41.2.803-809.2003].
17. Tahiliani P, Kumar MM, Chandu D, Kumar A, Nagaraj C, Nandi D. Gel purified LipL32: A prospective antigen for detection of leptospirosis. *J Postgrad Med*.2005;51:164-8.
18. McBride AJA, Pereira FA, Silva ED, Matos RB, Silva ED, Ferreira AGP, et al. Evaluation of the EIE-IgM-Leptospirose assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *Acta Trop*. 2007;102(3):206-11. [DOI: 10.1016/j.actatropica.2007.05.002].
19. Tanganuchitcharnchai A, Smythe L, Dohnt M, Hartskeerl R, Vongsouvath M, Davong V et al. Evaluation of the Standard Diagnostics *Leptospira* IgM ELISA for diagnosis of acute leptospirosis in Lao PDR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.2012;106(9):563-6. [DOI: 10.1016/j.trstmh.2012.06.002].
20. Addamiano L, Babudiaeri B. Water strains of *Leptospira* in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. *Bull World Health Organ*.1968;39(6):925-34.
21. Corrêa MO, Natale V, Sadatsune T, Fleury GC. Practical value and use of Patoc I *Leptospira* semaranga in the diagnosis of human leptospirosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*.1970;12(4):284-7.
22. Girio RJS, Mathias LA. Use of saprophytic *Leptospira* strains in the serodiagnosis of experimental leptospirosis in guinea-pigs (*Cavia* sp). *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 988;30(2):91-4. [DOI: 10.1590/S0036-46651988000200007].
23. Ahmad SN, Shah SH, Ahmad FM. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Postgrad Med*. 2005;51:195-200.
24. Blanco RM, Takei K, Romero EC. Leptospiral glycolipoprotein as a candidate antigen for serodiagnosis of human leptospirosis. *Lett Appl Microbiol*.2009;49(2):267-73. [DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02650.x].

25. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci*.2008;33:557-69.
26. Helmerhorst HJ, Van Tol EN, Tuinman PR, de Vries PJ, Hartskeerl RA, Grobusch MP et al. Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. *Neth J Med*.2012;70(5):215-21.
27. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*.2009;64(3):247-55. [DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014].
28. Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. ELISA for the Detection of Specific IgM and IgG in Human Leptospirosis. *J Gen Microbiol*.1985;131:377-85.
29. Cumberland P, Everard COR, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and Microscopic Agglutination Test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*.1999;61(5):731-4.
30. Levett PN, Branch SL. Evaluation of two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Methods for detection of Immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(6):745-8.
31. Sakata EE, Yasuda PH, Romero EC, Silva MV, Lomar AV. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1992;34:217-21. [DOI: 10.1590/S0036-46651992000300006].
32. Romero EC, Bernardo CCM, Yasuda PH. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2003;45(5): 245-48. [DOI: 10.1590/S0036-46652003000500002].
33. Romero EC, Blanco RM, Galloway RL. Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. *Lett Appl Microbiol*.2009;48:623-7. [DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02580.x].
34. Sehgal SC, Vijayachari S, Sharma S, Sugunan AP. LEPTO Dipstick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93:161-4.

Hepatitis B monovalent vaccines produced by different manufacturers: comparative study on the quality of vaccine in period before and after the shelf life

Vacinas de Hepatite B monovalente produzidas por diferentes fabricantes: estudo comparativo da qualidade das vacinas no período pré e após o prazo de validade

RIALA6/1642

Renata Faria de CARVALHO¹, Simone Ferreira Teixeira BASTOS¹, Fernando FINGOLA², Kátia Christina LEANDRO³, Catia Ines COSTA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP:21040-900. Tel: 21 3865-5272, fax: 21 2290-0915. E-mail: catia.costa@incqs.fiocruz.br

²Departamento de Toxicologia e Farmacologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ-RJ.

³Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ- RJ.

Recebido: 10.12.2014 - Aceito para publicação: 25.06.2015

ABSTRACT

For over 20 years, the hepatitis B (HB) vaccine has been produced by the expression of the viral gene encoding the hepatitis B surface antigen (HBsAg) in yeast. According to the data from WHO, the hepatitis B vaccines are generally stable for up to three years when stored at 2 °C to 8 °C. The purpose of this study was to evaluate whether the hepatitis B vaccine, at the time of their release, the quality criteria of this product were maintained seven years after the expiration date. Vaccine vials in multi-dose (10 and 05 doses) and three lots from each manufacturer (A, B and C) were analyzed. All batches were assayed for visual appearance, potency, bacterial endotoxin, thiomersal amount, aluminum hydroxyde contents and pH by means of validated tests. The nine lots evaluated seven years after the expiration date showed similar concentrations when compared to those demonstrated at the time of batches release by the National Institute for Quality Control in Health (INCQS). No significant change in the quality of the hepatitis B vaccine after the expiration date was confirmed. These data might be useful to subsidize a future evaluation for reviewing an extension of the vaccines shelf life.

Keywords. hepatitis B vaccine, quality control, shelf life, potency, stability.

RESUMO

As vacinas contra a hepatite B são produzidas pela expressão do gene viral codificado para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) em levedura, há mais de 20 anos. De acordo com os dados da OMS, a vacina de hepatite B tem até três anos de estabilidade quando armazenada entre 2 °C e 8 °C. O objetivo deste estudo foi de avaliar se, no momento da liberação, os critérios de qualidade da vacina de hepatite B foram mantidos após sete anos da data de validade. Foram analisados frascos de vacinas multi-dose (10 e 5 doses), sendo três lotes de cada produtor (A, B e C). Todos os lotes foram avaliados quanto às características de aparência visual, potência, endotoxina bacteriana, presença de timerosal, conteúdo de hidróxido de alumínio e pH por meio de testes validados. Os nove lotes avaliados sete anos após a data de expiração tiveram resultados similares quando comparados às concentrações na época de liberação dos lotes, realizada pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Os estudos confirmaram a manutenção da qualidade da vacina após o período de expiração. Estes dados podem subsidiar uma futura avaliação para extensão do prazo de validade das vacinas.

Palavras-chave. vacina contra hepatite B, controle de qualidade, prazo de validade, potência, estabilidade.

INTRODUCTION

Hepatitis B viruses (42 nm spherical particles) is classified into the family *Hepadnaviridae*, presenting DNA involved by an icosahedral capsid and finally by a lipoproteic envelope, that consist of three proteins composing the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). These viruses cause an infectious life-threatening liver disease and leading frequently to chronic liver disease, which causes high risk of death from liver cirrhosis and liver cancer¹. Prevention of infection through thorough vaccination is the most effective strategy to reduce global morbidity and mortality². Hepatitis B vaccine is 95 % effective in preventing HBV infection and its chronic consequences, and is the first vaccine against a major human cancer. The vaccine has an outstanding record of safety and effectiveness. Recombinant hepatitis B vaccines have been produced by the expression of the viral gene coding for hepatitis B surface antigen (HBsAg) in yeast for over 20 years^{3,4}.

Recombinant hepatitis B vaccines are available as monovalent products or included in combined vaccines together with other antigens such diphtheria toxoid, tetanus toxoid, whole-cell or acellular pertussis components, *Haemophilus influenzae* type B conjugated antigen and inactivated poliomyelitis viruses⁵⁻⁸.

Hepatitis B vaccine is a liquid suspension consisting of purified hepatitis B surface antigen (HBsAg), which is adsorbed on aluminum salt, and additional components such as adjuvants and stabilizers. Antimicrobial preservatives are used in multidose presentations.

The quality of vaccines is guaranteed by the use of robust and reproducible production processes. Quality control of hepatitis B vaccines is based on World Health Organization's (WHO) recommendations^{9,10}, the European Pharmacopoeia monograph¹¹ and guideline for lots release^{12,13}. The quality control on release of final vaccine lots is performed both by the manufacturer and the national control laboratory of the country where a particular vaccine batch will be used.

The hepatitis B vaccine is used as a routine by the Brazilian National Immunization Program

(PNI) from the Ministry of Health for people under 49 years of age and to the priority groups with high exposition risk or high susceptibility, even out of age range¹⁴. As any other immunobiological used by PNI, the hepatitis B vaccine is sent to the National Institute for Quality Control in Health (INCQS) – Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) and submitted to laboratory and documentary analysis before releasing the batches for human use. All batches are evaluated for visual appearance, in vitro potency and identity, bacterial endotoxin, thiomersal, aluminum hydroxide contents and pH by validated tests¹⁵⁻¹⁹.

WHO recommendations for production, quality control and evaluation of vaccines feature stability as an important element. Data suggest that hepatitis B vaccines are apparently stable at elevated temperatures: for month at 20 °C to 25 °C, for one week at 37 °C and three days at 45 °C and for up to three years of shelf life when stored at 2 °C to 8 °C²⁰⁻²². The purpose of this study was to evaluate if the hepatitis B vaccine quality criteria at the time of release were maintained seven years after the expiration date.

MATERIAL AND METHODS

Sample vaccine

Hepatitis B monovalent vaccine samples expired after seven years at the recommended storage temperature at 4 °C were used for the study. The manufacturers were named as producer A, B and C (these codes were designated according to the policy). These samples were produced by the expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) using *Saccharomyces cerevisiae* (producer B) and *Hansenula polymorpha* (producers A and C) yeasts. The vaccines were in a multi-dose (10 and 05 doses) vial, randomly selected and three lots for each manufacturer were tested.

Product-specific reference vaccine

For comparison of vaccines coming from various types of production, all lots were determined *versus* the corresponding homologous reference vaccine^{23, 24}. The standard reference used by each manufacturer contains 20 µg/mL of HBsAg as evaluated by the Lowry protein assay⁹.

Evaluation of retrospective data at time of batches release

Batches of hepatitis B vaccine from three different manufacturers were evaluated for the visual appearance, determination of the *in vitro* potency, endotoxin, thiomersal, aluminum hydroxide and pH.

Visual appearance of the vaccine

Color and opacity of suspensions were monitored and reported for the vaccine-specific in its final container.

***In vitro* potency and identity determination**

The potency and identity of lots of hepatitis B monovalent vaccines, before and after shelf life, were evaluated by their HBsAg content in triplicates at concentrations 0.25, 0.5, 1.0 and 1.5 ng/mL using a commercial kit, Murex immune assay (Abott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), according to the producer instructions. The antigen potency of each vaccine batch was calculated *versus* its homologous reference using a parallel-line model²⁵ and expressed in µg/mL.

Bacterial endotoxin content

The *Limulus* amoebocyte lysate test (test LAL) is accepted by the test for bacterial endotoxins²⁶. The LAL test was performed in-house according to the European Pharmacopoeia monograph using the semi-quantitative gel clot method (Lonza Walkersville, Inc, USA). Since one International Unit (IU) of endotoxin is equal to one endotoxin unit (EU), the values were expressed in EU/mL. The specification for the bacterial endotoxin content in the vaccines is ≤ 10 EU/mL²⁷.

Thiomersal content

The electroanalytical methodology for the determination of thiomersal content, in each final lot vaccines was developed utilizing the differential pulse voltammetry system of Metrohm model 757 VA Computrace coupled to an electrochemical cell composed by three electrodes²⁸. The specification for the thiomersal content in the vaccines is ≤ 200 ppm²⁷.

Aluminum hydroxide content

Each final lot was assayed for the aluminum hydroxide content. The method used and the permitted concentration was determined according to the European Pharmacopoeia monograph¹¹. The amount of aluminum permitted in the recommended single human dose of a product should not be more than 1.25 mg/mL^{27,29,30}.

pH

The pH values of the lots of vaccines were measured using a pHmeter of a glass electrode (InoLab pH Level 2, WTW). The specification for the vaccines pH is from 5.5 to 7.4²⁷.

Statistical analysis

The statistic tests Shapiro-Wilk (normality), paired t-Student (parametric) and Wilcoxon (non parametric) were used to the comparative evaluation for the results obtained during the time of release and seven years following the expiration date³¹.

RESULTS

Visual appearance of the products

Products were translucent and showed uniform appearance, without development of agglomerates even after vigorous shaking.

Comparative analysis for the potency at time of batch release and after the expiration period

The vaccines potency of all evaluated lots at the time of release were (21.28, 20.77 and 18.37 µg/mL) for manufacturer A; (20.82, 26.80 and 20.0 µg/mL) for manufacturer B and (21.29, 19.58 and 20.0 µg/mL) for manufacturer C, respectively. The potency for the same lots of vaccine after the expiration date were (22.07, 24.53 and 21.77 µg/mL) for manufacturer A; (21.52, 28.70 and 19.87 µg/mL) for manufacturer B and C (18.14, 21.10 and 17.73 µg/mL) for manufacturer C, respectively. The comparative analysis obtained from all nine tested lots showed good concentration of antigen, with no statistically significant differences on the tested vaccines expired after seven years of their designated shelf life (Figure 1).

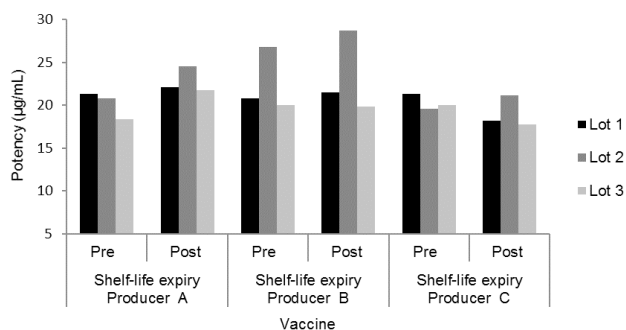


Figure 1. Vaccine potency data for pre and post shelf-life expiration date for hepatitis B vaccine stored at 2 °C - 8 °C. The statistical analysis comparing before and after resulted in *p*-value 0.1053, 0.2971 and 0.4599 for producer A, B and C, respectively

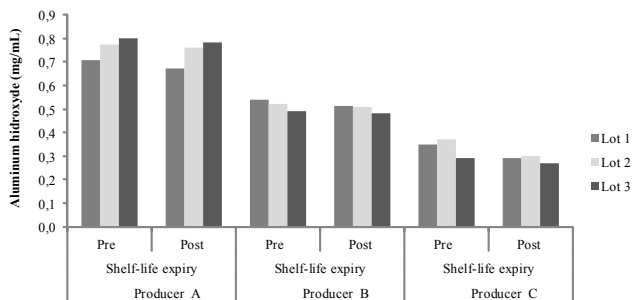


Figure 2. Graphical representation of Aluminum hydroxide values obtained in pre and post shelf-life for A, B and C producers. The statistical analysis comparing before and after resulted in *p*-value 0.0730, 0.0655 and 0.0663 for producer A, B and C, respectively.

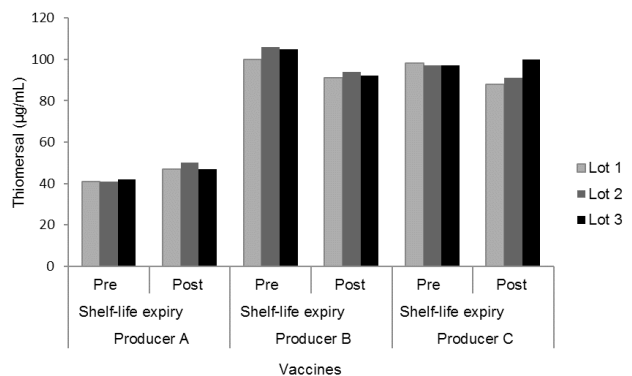


Figure 3. Comparison of thiomersal contents for hepatitis B vaccines at the time of release and seven years after the expiration date. The statistical analysis comparing before and after resulted in *p*-value 0.0898, 0.1797 and 0.3273 for producer A, B and C, respectively

Aluminum hydroxide content

Lots of vaccines containing aluminum hydroxide after expiration date were evaluated among different manufacturers. In general, the content varies among each vaccine manufacturer A, B and C. The comparative analysis after expiration date showed results similar to observed at the time of the batch release (Figure 2).

Thiomersal content

All lots of vaccine after expiration date showed thiomersal contents similar to observed at the time of the batch release (Figure 3).

Bacterial endotoxin content

The endotoxin contents determined seven years after expiration date showed vaccines from manufacturer A contained > 2.5 and < 5.0 EU/mL, those from manufacturer B contained > 0.1 and < 2.5 EU/mL, while those from manufacturer C contained > 1.25 and < 5.0 EU/mL (Table 1).

pH

The pH value of each final vaccine lot tested showed results within the range from values 6.0 to 7.0 after and before expiration period (Table 2).

Statistical analysis

The comparative analysis for the obtained results, using vaccine samples before and after expiration date, for potency determination and aluminium hydroxide content (t-Student) and thiomersal content (Wilcoxon) has presented a *p*-value greater than the 0.05 significance level (*p* > 0.05). It indicates that is not possible to prove statistically that the samples before and after expiration date have different results.

DISCUSSION

A comparative study for the vaccines quality was conducted with samples vaccines from three manufacturers. The potency of the lots of vaccines was evaluated by using the *in vitro* potency with product-specific reference preparation³². All nine lots hepatitis B vaccines evaluated seven years of their

Table 1. Endotoxin content from different manufacturers of hepatitis B vaccines seven years after the expiration date

Lots	Manufacturers of hepatitis B vaccines		
	Producer A	Producer B	Producer C
	Post shelf-life expiry	Post shelf-life expiry	Post shelf-life expiry
Lot 1	> 2.5 and < 5 EU/mL	> 1.25 and < 2.5 EU/mL	≤ 2.5 EU/mL
Lot 2	≤ 2.5 EU/mL	> 1.25 and < 2.5 EU/mL	> 1.25 and < 2.5 EU/mL
Lot 3	> 1.25 and < 2,5 EU/mL	> 0.125 and < 1.25 EU/mL	> 2.5 and < 5 EU/mL

licensed expiration date had similar potency concentrations when compared to potency at time of batches release. All lots were within the specifications even after several years following the expiration date of their designated shelf life. The samples were stored at 2 °C to 8 °C, which is probably responsible for maintaining the stability after seven years of the end of validity. The comparative analysis obtained from all nine tested lots showed good concentration of antigen, with no statistically significant differences on the tested vaccines after seven years following the expiration date³³.

The vaccine stability evaluation is defined as a science-driven procedure based on clearly defined quality criteria: the ability of a vaccine to retain its chemical, physical, microbiological and biological properties within specified limits throughout its shelf life. This study showed that stability remained constant^{34,35}, no significant differences ($p > 0.05$) were observed for the lots tested before and after shelf life.

The vaccines differed only in potency among manufacturers A, B and C probably because of the diversity in the reactivity of vaccines produced by different manufacturing techniques used for formulation³⁶. WHO recommendations for production, quality control and evaluation of vaccines feature stability as an important element. Data from the WHO shows hepatitis B vaccines as generally stable for up to three years of shelf life when stored at 2 °C to 8 °C²².

Comparative analysis of bacterial endotoxin was not made because pyrogen assays were determined at the time of release. The levels of endotoxin were very consistent within product license specifications required (≤ 10EU/mL). The LAL test showed that the vaccine vials tested were pyrogen free, as expected. All evaluated lots were satisfactory in all parameters of quality control. Results from the study suggested there was no impact on vaccines quality after shelf life.

Table 2. Comparison of pH for batches of hepatitis B vaccines at the time of release and seven years after the expiration date

Lots	Manufacturers of hepatitis B vaccines					
	Producer A		Producer B		Producer C	
	Shelf-life expiry		Shelf-life expiry		Shelf-life expiry	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Lot 1	7.0	7.0	6.0	6.0	7.0	7.0
Lot 2	7.0	7.0	6.0	6.0	7.0	7.0
Lot 3	7.0	7.0	6.0	6.0	7.0	7.0

CONCLUSION

The hepatitis B vaccine presented an excellent stability, all batches were in accordance to the requirements described in the official compendium. The importance of proper storing showed that the quality of the vaccines produced by three different manufactures has remained stable after years following the expiration date. This study may contribute to a future extension of the validity period of the vaccines stored at the recommended temperature (2 °C to 8 °C). Currently the validity period is three years.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by National Institute of Quality Control in Health - INCQS - FIOCRUZ - Brazil.

REFERENCES

1. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses. In: Fields Virology. 6^a ed. Knipe DM, Howley PM (eds). Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA, 2013. 2185-221.
2. Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. *Vaccine*.2008;26:6266-73. [DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.09.056].
3. World Health Organization -WHO. Immunization, Vaccines and Biologicals. Hepatitis B. Geneva; 2010.
4. World Health Organization -WHO. Immunization, Vaccines and Biologicals. Hepatitis B. Geneva; 2014. [acesso 2014 Nov 20]. Disponível em: [http://www.who.int/immunization/diseases/hepatitisB/en/].
5. Decker MD. Principles of pediatric combination vaccines and practical issues related to use in clinical practice. *Pediatr Infect Dis J*.2001;20(11 Suppl):S10-8.
6. Decker M, Bogaerts H, Edwards K. Combination vaccines. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit PA (eds). *Vaccines*. 5^a ed. USA: Saunders Co; 2008. p. 1069-101.
7. Ellis RW. Development of combination vaccines. *Vaccine*.1999;17(13-14):1635-42. [DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00424-1].
8. Pichichero ME. New combination vaccines. *Pediatr Clin North Am*.2000;47(2):407-26. [DOI: 10.1016/S0031-3955(05)70214-5].
9. World Health Organization - WHO. Requirements for Hepatitis B vaccines Made Recombinant DNA Techniques. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-ninth report. Geneva, 1989, Annex 2, WHO Technical Report Series n. 786.
10. World Health Organization -WHO. Requirements for Hepatitis B vaccines Made Recombinant DNA Techniques. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-eighth report. Geneva, 1999, Annex 4, WHO Technical Report Series n. 889. p. 94-95. [acesso 2014 Out 20]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42202/1/WHO_TRS_889.pdf].
11. European Pharmacopoeia. Hepatitis B vaccine, 8.0, volume I, 01/2014. Strasbourg: EDQM Council of Europe.
12. U.S. Food and Drug Administration - FDA. Biological Products: general provisions. Code of Federal Regulations. Title 21, sec 600.15 -Temperatures during shipment. Washington, DC: US Government Printing Office; 2007.
13. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care – EDQM. EU Administrative procedure for Official Control Authority batch release: Control authority batch release of vaccines and blood products. Strasbourg: Council of Europe, 2012.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta n.2/2013/CGPNI/DEVEP e CGDHRV/DST-AIDS/SVS/MS. Ampliação da oferta da vacina hepatite B para a faixa etária de 30 a 49 anos em 2013. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. [acesso 2015 Jun 11]. Disponível em: [http://www.saude.rs.gov.br/upload/1372685606_11%20Nota%20Tecnica%20N%C2%BA%20022013%20-%20vacina%20hepatite%20B%2030%20a%2049%20anos.pdf].
15. US Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Update expanded availability of thimerosal preservative – free hepatitis B vaccine. *Morb Mort Weekly Rep*. 2000;49(28):642-65.

16. Clapp T, Siebert P, Chen D, Braun LTJ. Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability. *J Pharm Sci*. 2011;100(2):388-401. [DOI: 10.1002/jps.22284].
17. United States Pharmacopeia – USP 23 - National Formulary 19. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2000.
18. Birner J, Garnet JR. Thimerosal as a preservative in biological preparations. I. Application of polarography to the determination of thimerosal in aqueous solutions and vaccines. *J Pharm Sci*. 1964 Oct; 53:1264-5.
19. Page JE, Waller JG. Polarographic determination of thiomersalate. *Analyst*. 1949;74:292-6. [DOI: 10.1039/AN9497400292].
20. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH Harmonised Tripartite Guideline. ICH Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products. February 6, 2003. [acesso 2014 Out 24]. Disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf].
21. U.S. Food and Drug Administration - FDA. Biological Products: general provisions. Code of federal regulations. Title 21, sec 600.3. Washington, DC: US Government Printing Office; 2007.
22. World Health Organization – WHO, Global Programme for Vaccines and Immunization. Thermostability of vaccines. Geneva: WHO; 1998. (Publication WHO/GPV/98.07)
23. Dobbelaer R. Collaborative study for the establishment of biological reference preparations for rDNA hepatitis B vaccine. *Pharmeuropa Special Issue, BIO* 1997; 2:3-18.
24. European Pharmacopeia. Method of analysis, Biological assays. Assay of hepatitis B vaccine (rDNA). General chapter 2.7.15. 5^a ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 2005.
25. European Pharmacopeia. Statistical analysis, 8.0, volume I, 01/2014. Strasbourg: EDQM Council of Europe.
26. European Pharmacopeia. Bacterial Endotoxins, 7.0. Strasbourg: Council of Europe, 2011; p.171-5.
27. Farmacopeia Brasileira. 4 ed., parte 2, n. 5, São Paulo: Atheneu, 2004.
28. Birner J, Garnet JR. Thimerosal as a preservation in biological preparations. Application of polarography to the determination of thimerosal in aqueous solutions and vaccines. *J Pharm Sci*. 1964;53(10):1263-5.
29. Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines – US perspective. *Vaccine*. 2002;20 (Suppl 3):S18-23.
30. Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32(3):155-172.
31. Finney DJ. Chapter 4 Parallel line assays. In: *Statistical Methods in Biological Assay*. 3^a ed. London: Charles Griffin and Company Ltd; 1978. p. 69-104.
32. Hendriksen CFM, Garthoff B, Aggerbeck H, Bruckner L, Castle P, Cussler K et al. Alternatives to animal testing in the quality control of immunobiologicals: current status and future prospects. The report and recommendations of ECVAM workshop 4. *ATLA*. 1994; 22:420-34.
33. Pierard I, Spelte G, Le Tallec D, Duchêne M. Consideration on a few aspects of the stability studies post licensure. *Biologicals*. 2009;37(6):403-6. [DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.011].
34. Fairweather WR, Mogg R, Bennett PS, Zhong J, Morrisey C, Schofield TL. Monitoring the stability of human vaccines. *J Biopharm Stat*. 2003;13(3):395-413. [DOI:10.1081/BIP-120022762].
35. Schofield TL. Maintenance of vaccine stability through annual stability and comparability studies. *Biologicals*. 2009;37(6):397-402. [DOI: 10.1016/j.biologicals.2009.08.010].
36. World Health Organization - WHO. Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines. Proposed replacement of: WHO Technical Report Series, N° 786, Annex 2 and Technical Report Series, N° 889, Annex 4. Geneva, World Health Organization, 2010. [acesso 2014 Nov 06]. Disponível em: [http://www.who.int/biologicals/HEP_B_Recomm_after_ECBS_endorsment_final].

Estudo da identidade histológica de subprodutos de soja (*Glycine max* L.)

Study on the histological identity of soy products (*Glycine max* L.)

RIALA6/1643

Elaine Cristina de MATTOS*, Márcia Bittar ATUI, Augusta Mendes da SILVA, Antônio Roberto FERREIRA, Márcia Dimov NOGUEIRA, Juliane dos Santos SOARES, Maria Aparecida Moraes MARCIANO

*Endereço para correspondência: Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-000. Tel: 11 3068-2934. E-mail: nanimattos@hotmail.com

Recebido: 02.03.2015 - Aceito para publicação: 24.06.2015

RESUMO

A partir do grão de soja são obtidos diversos subprodutos, tais como farinha, farelo, proteína texturizada e óleo, constantemente utilizados em formulações de alimentos como biscoitos, pães, chocolates, entre outros. Durante o processamento, a estrutura da soja pode ser alterada, de forma a impossibilitar a identificação histológica deste vegetal nos produtos alimentícios. Este trabalho teve como objetivo identificar as características histológicas de diferentes subprodutos de soja. Amostras de proteína texturizada de soja, proteína de soja desengordurada, proteína isolada de soja e proteína de soja concentrada foram cedidas por uma indústria processadora de soja. Estas amostras foram submetidas à análise histológica, seguindo-se os Métodos Oficiais do Instituto Adolfo Lutz, para verificação da presença dos elementos histológicos característicos. Dentre os quatro subprodutos analisados, somente a proteína isolada de soja não apresentou elementos histológicos característicos. A proteína de soja concentrada apresentou menor quantidade de elementos histológicos em relação à proteína texturizada de soja e à proteína de soja desengordurada. Estes achados contribuirão para a análise de produtos à base de soja no que se refere à sua composição, a fim de identificar possíveis fraudes ou contaminações.

Palavras-chave. soja, subprodutos, histologia, identificação, fraudes.

ABSTRACT

From the soya beans are obtained various by-products such as flour, meal, textured protein and oil, which are regularly used in food formulations such as cookies, breads, chocolates, among others. During the food processing, the soya structure might be changed, and turning into hard to perform the histological identification of this vegetable in the food products. This study aimed at identifying the histological characteristics of different soy sub-products. Textured soy protein, defatted soy protein, soy-isolated protein and concentrated soy protein samples were provided by a soybean processor industry. These samples were investigated by means of histological analysis, according to the Official Methods of the Instituto Adolfo Lutz for detecting the presence of the characteristic histological elements. Among the four analyzed sub-products, the isolated soy protein only showed no characteristic histological elements. The concentrated soy protein showed the lowest amounts of histological elements in relation to the textured soy protein and the defatted soy protein. These findings will contribute to the soya-based products analyses concerning their composition, in order to identify the potential fraud or contamination.

Keywords. soy, by-products, histology, identification fraud.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) é a principal cultura agrícola do Brasil, em volume e geração de renda. O complexo soja responde por aproximadamente 1,5 % do PIB do Brasil e as exportações são uma importante fonte de divisas internacionais do país (cerca de 11 % das exportações totais)¹.

O Brasil é o segundo maior produtor do mundo, com produção de 75 milhões de toneladas, e produtividade média de 3.106 kg.ha⁻¹ em uma área plantada de 24,2 milhões de hectares².

A indústria nacional transforma, por ano, cerca de 30,7 milhões de toneladas de soja, produzindo 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo protéico, contribuindo para a competitividade nacional na produção de carnes, ovos e leite. Além disso, a soja e o farelo de soja brasileiros possuem alto teor de proteína e padrão de qualidade Premium, o que permite sua entrada em mercados extremamente exigentes como os da União Europeia e do Japão³.

O aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e à eficiência dos produtores. O grão é a principal fonte de proteína vegetal, componente essencial na fabricação de ração animal. Além disso, seu uso na alimentação humana encontra-se em franco crescimento⁴.

A soja, conhecida há mais de 5000 anos no Oriente e sendo nativa da China, tornou-se um produto amplamente cultivado devido a sua fácil adaptação em climas temperados e frios, sendo seu consumo muito incentivado, pelos seus benefícios a saúde. Cultivada especialmente nas regiões Centro Oeste e Sul do país, a soja se firmou como um dos produtos mais destacados da agricultura nacional e na balança comercial⁵.

No Brasil, o grão chegou com os primeiros imigrantes japoneses em 1908, mas foi introduzida oficialmente no Rio Grande do Sul em 1914. Porém, a expansão da soja no Brasil aconteceu apenas nos anos 70, com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional^{5,6}.

A soja é uma planta anual, herbácea, ereta, autógama, apresentando variabilidade para as características morfológicas, que ainda podem ser influenciadas pelo ambiente, de porte herbáceo

(de 0,80 a 1,5 m de altura) e constitui um dos mais importantes alimentos do homem, pois é rica em substâncias nutritivas. Possui um elevado teor de proteínas, gorduras, sais minerais e vitaminas^{6,7}.

Diversos autores mencionam os efeitos benéficos do consumo da soja e seus derivados dentre os quais citam a prevenção de doenças cardiovasculares, redução da incidência de infarto e derrame cerebral, aumento de massa magra, diminuição do risco de determinados tipos de câncer e osteoporose, bem como proteção do organismo contra o envelhecimento causado pelos danos celulares, sendo, dessa forma, um alimento que adquiriu grande importância comercial recentemente devido a essas propriedades nutricionais⁸⁻¹¹.

Os produtos a base de soja também são indicados a indivíduos com intolerância à lactose, bem como para mulheres durante a menopausa, como alternativa natural para a reposição hormonal. Além disso, o consumo em forma de grão ou farinha integral possibilita a absorção dos elementos bioativos importantes para as mulheres^{5,12}.

A partir do aumento da produção de soja e do conhecimento da mesma pela população, o consumo aumentou e além do óleo de soja, que sempre foi o principal produto comercializado, foram desenvolvidos outros produtos como leite de soja (extrato protéico de soja), leite de soja saborizado, tofu (queijo de soja), farelo e farinha de soja, concentrado e isolados protéicos de soja, proteína texturizada de soja (PTS), missô (pasta de soja) e shoyu (molho de soja)⁵.

Para a obtenção dos subprodutos de soja, é necessário realizar o processamento dos grãos, que abrange desde o recebimento das sementes, armazenamento, preparação, extração do óleo e finalmente a produção da farinha propriamente dita. Atualmente a extração é realizada em processo contínuo para obter-se um produto mais uniforme e visando minimização dos custos, pois o processo é complexo exigindo fluxos de solventes, vapor, temperaturas, vácuos entre outros¹³.

A proteína texturizada de soja é o produto protéico dotado de integridade estrutural identificável, de modo a que cada unidade suporte hidratação e cozimento, obtidos por fiação e extrusão termoplástica, a partir de uma ou mais

das seguintes matérias-primas: proteína isolada de soja, proteína concentrada de soja e farinha desengordurada de soja. A proteína texturizada de soja é utilizada como ingrediente de alimentos como fonte protéica e como extensor em produtos de carne. A proteína texturizada de soja, ou carne de soja, é obtida através das seguintes etapas: inicialmente, retira-se da soja moída o seu óleo e o seu carboidrato, através de solventes químicos e alta temperatura. Em seguida, mistura-se uma solução alcalina para separar as fibras. Logo após, submete-se a um processo de precipitação e separação utilizando um banho ácido. Por último, vem um processo de neutralização através de uma solução alcalina. Segue-se uma secagem a altas temperaturas e à redução do produto em um pó. Este produto, altamente manipulado, possui seu valor nutricional totalmente comprometido. Durante o processo, perdem-se as vitaminas, porém permanecem os inibidores da tripsina. Deve apresentar no mínimo 50 % g/100 g de proteína^{3,5,6}.

A proteína de soja desengordurada é o produto obtido a partir dos grãos de soja convenientemente processados até a obtenção da farinha desengordurada e deve apresentar um mínimo de 45 % g/100 g de proteína¹⁴.

A proteína de soja concentrada é o produto protéico, concentrado por processo tecnológico adequado, a partir da farinha de soja, envolvendo um processo alcoólico ou aquoso com objetivo de eliminar os açúcares, por meio da alteração do pH, obtendo um produto com teor mínimo de proteína de 68 % g/100 g¹⁴.

A proteína isolada de soja é a fração protéica da soja obtida por processo tecnológico adequado. É utilizada como agente de consistência para produtos derivados de carnes, tais como embutidos e patês, e como fonte protéica¹⁴.

Diante deste contexto, faz-se necessário que os profissionais da área de Microscopia Alimentar estejam capacitados para a identificação dos elementos histológicos característicos da soja, para que se possa confirmar a sua presença nos subprodutos contidos na formulação de alimentos para consumo humano.

As características microscópicas do grão de soja foram descritas pela primeira vez por Winton e Moeller¹⁵, Menezes Júnior⁶ e Gasser et al¹⁶ e foram os parâmetros utilizados neste estudo.

O Núcleo de Morfologia e Microscopia realiza a pesquisa e identificação dos elementos histológicos vegetais presentes nos alimentos, com a finalidade de verificar a identidade e qualidade dos ingredientes vegetais de sua composição. A análise microscópica é uma ferramenta importante na verificação de fraudes e veracidade da formulação ou da lista de ingredientes declarada no rótulo do produto. O assunto tratado neste trabalho é de imensa relevância para a prática de Microscopia de Alimentos nos laboratórios de análise. Esta área carece de estudos específicos para os mais variados temas, o que torna este trabalho uma importante ferramenta no estudo da identidade histológica dos alimentos que contenham em sua composição a soja e seus derivados.

O objetivo deste estudo foi identificar os elementos histológicos característicos da soja em seus subprodutos, uma vez que estes são ingredientes de preparações alimentícias. Dentre os subprodutos da soja mais empregados, podemos destacar a proteína texturizada de soja, a proteína de soja desengordurada, a proteína isolada de soja e a proteína de soja concentrada, objetos deste estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados quatro tipos de proteínas derivadas de soja: texturizada, desengordurada, isolada e concentrada. Estes subprodutos industrializados foram cedidos por uma empresa processadora de soja, e foram analisados no Núcleo de Morfologia e Microscopia, do Centro de Alimentos, do Instituto Adolfo Lutz, em julho de 2014.

A metodologia utilizada para o preparo das amostras foi extraída do livro *Métodos de Análise Microscópica de Alimentos: Isolamento de Elementos Histológicos*¹⁷.

Os ensaios foram realizados por quatro analistas que elaboraram o registro descritivo e fotográfico das estruturas vegetais presentes em cada subproduto analisado para demonstrar como estes podem ser identificados microscopicamente^{6,15,16}.

As imagens obtidas foram comparadas com a literatura existente, estabelecendo-se parâmetros de referência para o estudo histológico de cada subproduto analisado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A semente da soja é irregularmente ovóide ou esférica, conforme a variedade larga lateralmente e apresenta contorno uniforme e arredondado. Mede de 10 a 12 mm de comprimento, tem a pele (espermoderma) colorida que pode variar entre amarelo, vermelho, verde, pardo, preta ou misturada de cores diferentes; hilo distinto, de 3 a 4 mm de amplitude, como pode ser observado na Figura 1 (a, b, c). Os cotilédones são grandes, ricos em proteínas e matéria graxa e comumente sem amido⁶.

Na Figura 1 (b, c), observa-se a estrutura macroscópica do espermoderma, que é a camada que reveste a semente da soja.

Ao microscópio óptico evidencia-se a camada paliçada que é formada por células grandes, esclerificadas, retangulares, alongadas, apresentando luz aberta na base e se estreita até se tornar afilada em seu término, nas proximidades da epiderme externa, conforme Figura 1 (d, e, f).

Sua superfície externa é constituída por células elipsóides ou isodiamétricas, de paredes grossas, semelhantes a grãos de amido de feijão ou de lentilha, com estreita abertura linear, raiada na parte central, como se apresenta na Figura 1 (e).

A superfície interna é constituída por células anulares e de paredes grossas como pode ser observado na Figura 1 (d).

A subepiderme é composta por células em formato de carretéis grandes ou ampulhetas, ajustadas lado a lado, com espaços intercelulares elipsóides e com a parte superior mais estreita que a inferior. Estes carretéis são os elementos histológicos característicos da soja e devem ser procurados para identificação da leguminosa, conforme Figura 1 (g, h).

É importante ressaltar que ao exame microscópico, nem sempre se consegue visualizar todas estas estruturas morfológicas. Desta forma, deve-se procurar o elemento histológico que caracteriza a soja, que são os carretéis da subepiderme. Em preparações com conteúdo heterogêneo, a identificação desses carretéis é dificultada, necessitando de artifícios como a utilização de luz polarizada, a qual evidencia a presença dos mesmos durante o exame microscópico.

Outra importante ferramenta empregada nos estudos histológicos é o pré-tratamento da amostra com hidróxido de sódio a 3 %, que tem a função de quebrar os elementos histológicos do produto que possam interferir na pesquisa e identificação dos elementos característicos.

O que nos levou a realizar este trabalho foi a dificuldade em identificar os elementos histológicos característicos da soja em produtos alimentícios que contém os seus derivados. Dentre os vários subprodutos, selecionamos as proteínas mais utilizadas na indústria alimentícia que são as proteínas: texturizada, a desengordurada, a isolada e a concentrada.

Quando o produto alimentício é composto de vários ingredientes vegetais, o microscopista deve ter conhecimento dos elementos histológicos característicos, pois muitas vezes na mistura, não é possível identificar todos os elementos do vegetal, uma vez que o mesmo passou por etapas de processamento e também pode se apresentar em pequenas quantidades que dificultam a sua visualização.

O ensaio para a pesquisa e identificação histológica consiste no reconhecimento de células características de cada vegetal, sendo assim, o profissional deve ser capaz de diferenciar tais atributos em cada tipo de produto, revelando os ingredientes que fazem parte da formulação.

Os subprodutos de soja são constantemente utilizados em formulações de alimentos como biscoitos, pães, chocolates, embutidos, entre outros. A proteína texturizada de soja, dentre os subprodutos, é a matéria prima mais utilizada na indústria alimentícia.

No estudo da proteína texturizada foram possíveis de serem visualizadas as estruturas fundamentais da soja, Figura 2 (a, b, c); porém é indispensável o tratamento prévio da amostra com solução de hidróxido de sódio, que facilita a identificação dos elementos histológicos característicos, que só com a solubilização em água não seria possível. Diante deste resultado, podemos inferir que nos produtos alimentícios que contenham proteína texturizada de soja, há necessidade de tratamento prévio da amostra.

Para a análise da proteína de soja desengordurada, só a hidratação do produto

permitiu a visualização das estruturas características, demonstrando que o processo para obtenção deste subproduto não destrói os elementos histológicos do vegetal, nem dificulta sua visualização. Assim, dependendo da proporção que este subproduto da soja se apresentar na formulação no produto final, ela poderá ser facilmente caracterizada, como vemos na Figura 2 (d, e, f).

As observações feitas no subproduto proteína de soja concentrada demonstraram a presença dos elementos característicos, porém, em menor quantidade quando comparado aos subprodutos proteína texturizada e a desengordurada. Vale ressaltar que este subproduto

passa por processos químicos que podem alterar as estruturas existentes, como verificamos na Figura 2 (g, h, i), entretanto, ainda observáveis microscopicamente.

Por outro lado, na proteína isolada de soja, na Figura 2 (j) não são visualizados os elementos histológicos, pois esta é uma fração protéica da soja, obtida por processo tecnológico. Sendo assim, é possível afirmar que nos produtos em que é utilizado este subproduto, não há como identificar soja pelo exame microscópico, independentemente do tratamento utilizado na amostra. Foram observadas somente estruturas arredondadas, sem identificação microscópica distinta.

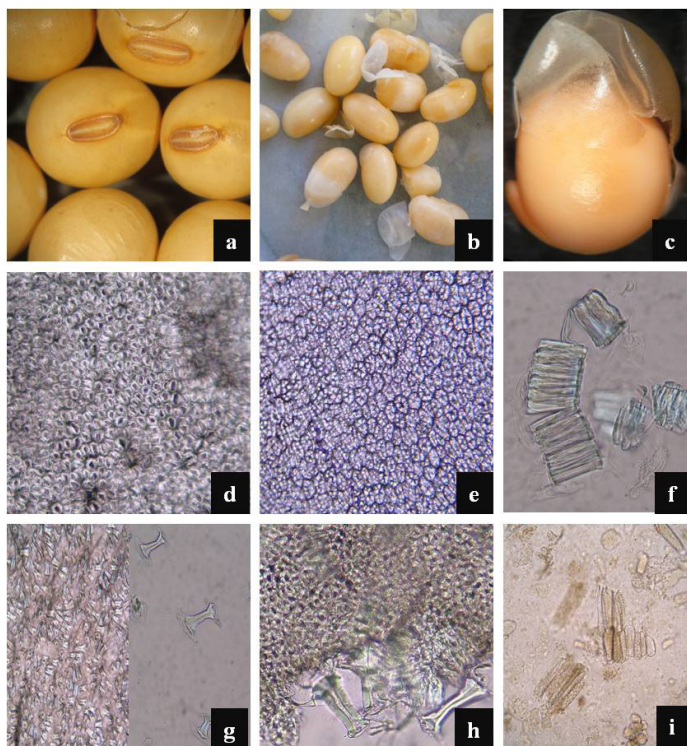


Figura 1. a. Fruto ou semente de soja; b e c. Detalhes do espermoderma da semente; d. Vista microscópica da epiderme interna da paliçada; e. Epiderme externa da paliçada; f. Células paliçadas vista longitudinal; g. Células da sub epiderme em forma de carretéis; h. Vista externa da camada paliçada e células da sub epiderme destacadas; i. Células de paredes finas do cotilédone com reserva de óleo e aleurona

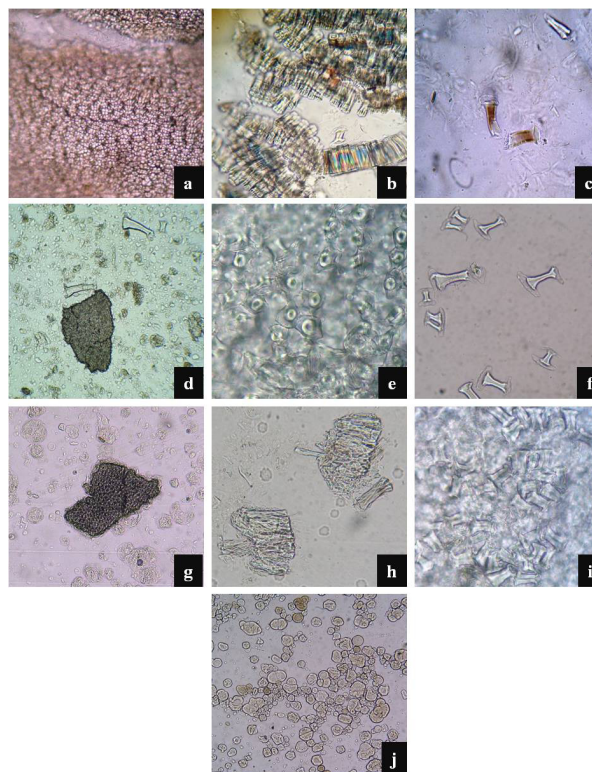


Figura 2. a, b e c. Proteína texturizada de soja sob aumento de 40x, o detalhe da vista externa da paliçada, células paliçadas vista longitudinal e células da sub epiderme soltas em carretéis; d, e e f. Proteína desengordurada de soja sob aumento de 20x, a epiderme interna da paliçada com células em carretel e em detalhe a vista interna das células da sub epiderme e, detalhe das células em carretel; g, h e i. Proteína concentrada de soja sob aumento de 20x, Vista interna da paliçada, Vista longitudinal da paliçada e sob aumento de 40x as células da sub epiderme vista lateral; j. Proteína isolada de soja sob aumento de 20x, estruturas sem identificação microscópica

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas amostras estudadas nos mostram que o único subproduto que não apresentou estruturas características de soja foi a proteína isolada e, por esta razão, necessita de um respaldo da área química, para a identificação deste vegetal nos diferentes tipos de alimento que é constituinte. Já nos tipos denominados de proteína texturizada, concentrada e desengordurada foi possível a visualização das estruturas da soja pela análise microscópica, permitindo assim, afirmar a presença de elementos histológicos deste vegetal nos diferentes produtos mesmo após seu processamento.

O presente estudo trouxe resultados expressivos frente à crescente demanda de análises de produtos à base de soja, tornando-se um importante instrumento para a identidade histológica do produto final, garantindo assim a veracidade das informações contidas na rotulagem e desta maneira contribuindo com o controle de qualidade dos mesmos.

AGRADECIMENTOS

À Viviane Ferraccioli pelo fornecimento das amostras analisadas.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais – ABIOVE. Sustentabilidade do complexo soja: reflexos da política econômica. [acesso 2015 Fev 28]. Disponível em: [http://www.abiove.org.br/site/_FILES/Portugues/25072013-105434-37._sober.pdf].
2. Carvalho LC, Ferreira FM, Bueno NM. Importância econômica e generalidades para o controle da lagarta falsa-medideira na cultura da soja. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer [Internet]. 2012;8(15):1021-34. Disponível em: [http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias%20agrarias/importancia%20economica.pdf].
3. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Soja. [acesso 2015 Fev 28]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja/saiba-mais].
4. Juhász ACP, Pádua GP, Wruck DSM, Favoreto L, Ribeiro NR. Desafios fitossanitários para a produção de soja. *Inf Agropec*.2013;34(276):66-75.
5. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - SBRT. Dossiê Técnico: Produtos de soja [acesso 2015 Fev 28]. Disponível em: [http://sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Mjg=].
6. Menezes Junior JBF. Soja: origem, composição química, valor nutritivo e aplicações diversas. *Rev Inst Adolfo Lutz*.1961;21:33-56.
7. Rocha RS. Avaliação de variedades e linhagens de soja em condições de baixa latitude [dissertação de mestrado]. Teresina (PI): Universidade Federal do Piauí; 2009.
8. Esteves EA, Monteiro JBR. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. *Rev Nutr*.2001;14(1):43-52. [DOI: 10.1590/S1415-52732001000100007].
9. Behrens JH, Silva MAAP. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. *Ciênc Tecnol Aliment*.2004;24(3):431-9. [DOI: 10.1590/S0101-20612004000300023].
10. Felberg I, Antoniassi R, Deliza R, Freitas SC, Modesta RCD. Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation. *Ciênc Tecnol Aliment*.2009;29(3): 609-17. [DOI: 10.1590/S0101-20612009000300024].
11. Jaekel LZ, Rodrigues RS. Effect of a soybean and rice beverage on the lipid and glycemic metabolisms in hamsters. *Ciênc Agrotec*.2011;35(6):1211-7. [DOI: 10.1590/S1413-70542011000600023].
12. Badger TM, Ronis MJJ, Hakkak R, Rowlands JC, Korourian S. The health consequences of early soy consumption. *J Nutr*.2002;132(3):559S-65S.

13. Marson LP. A produção de derivados da soja e sua aceitação pelo mercado consumidor [monografia]. Bento Gonçalves (RS): Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul; 2010.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005, Aprova o regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set. 2005.
15. Winton AL, Moeller J. The microscopy of vegetable foods. 1st ed. London: Chapman & Hall Ltd; 1906.
16. Gassner G, Hohmann B, Deutschmann F. Mikroskopische untersuchung pflanzlicher lebensmittel. 5 Auflage. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart; 1989.
17. Rodrigues RMM, Atui MB, Correia M. Métodos de análise microscópica de alimentos: isolamento de elementos histológicos. Vol. I. São Paulo: Letras & Letras; 1999.

Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de geleias de umbu-cajá elaboradas com e sem a adição de sacarose

Physical-chemical, microbiological and sensory characterization of jams made from *umbu-caja* prepared with and without the sucrose addition

RIALA6/1644

Emanuel Neto Alves de OLIVEIRA^{1*}, Dyego da Costa SANTOS², Ana Paula Trindade ROCHA², Josivanda Palmeira GOMES², Jorge Jacó Alves MARTINS², Joabis Nobre MARTINS³

*Endereço para Correspondência: ¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, BR 405, Km 154, Bairro Chico Cajá, Pau dos Ferros, RN, Brasil, CEP 59900-000. Tel: 84 4005-4109. E-mail: emanuel.oliveira16@gmail.com

²Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brasil

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Salgueiro, PE, Brasil

Recebido: 09.09.2013 - Aceito para publicação: 27.05.2015

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas geleias convencionais e dietéticas de umbu-cajá e as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos produtos foram avaliadas. No processamento das geleias convencionais foram utilizadas polpa de umbu-cajá, sacarose comercial e pectina de alto teor de metoxilação (ATM). Nas geleias dietéticas, a sacarose e a pectina ATM foram substituídas por aspartame e pectina de baixo teor de metoxilação (BTM). As formulações foram concentradas em tacho aberto até obter o teor de sólidos solúveis totais de ~63 °Brix (produto convencional) e de ~12,5 °Brix (geleia dietética), e então envasilhadas em recipientes de vidro. As geleias foram submetidas a análises microbiológicas e, posteriormente, aos testes de aceitação (cor, aparência, aroma, consistência, sabor, doçura, impressão global), além da intenção de compra. As geleias apresentaram conformidade com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação. As amostras adicionadas de sacarose obtiveram escores compreendidos entre 7,15 (doçura) e 8,25 (cor). As geleias isentas de sacarose tiveram escores que variaram de 4,93 (doçura) a 7,08 (aroma), e em apenas um atributo sensorial obtiveram nota superior a 7,0. Dentre as geleias avaliadas, as convencionais demonstraram as maiores frequências de aceitação (> 80 %) e intenção de compra (> 75 %), que indicam o potencial destes produtos para futura industrialização e comercialização.

Palavras-chave. *Spondias* spp., processamento, açúcares, aceitação sensorial.

ABSTRACT

This study aimed at developing the conventional and dietary jams made from *umbu-caja*, and their physical-chemical, microbiological and sensory characteristics were evaluated. *Umbu-caja* pulp, commercial sucrose and high methoxylated pectin (HMP) were used for processing the conventional jams. For preparing the dietary jams, the sucrose and pectin HMP were replaced by aspartame and low methoxylation pectin (LMP). The formulations were concentrated in an open pan until achieving the soluble solids content of ~63 °Brix (conventional jam) and of ~12.5 °Brix (dietary formulation), and then they were poured into glass jars. The microbiological assays, the acceptance tests (color, appearance, aroma, consistency, taste, sweetness, overall impression), and the purchase intent were performed for analyzing the processed jams. The both products were within the microbiological standards established by legislation. The sucrose-containing samples presented scores ranging from 7.15 (sweetness) to 8.25 (color). The sucrose-free jams showed scores ranging from 4.93 (sweetness) to 7.08 (aroma), and in only one sensory attribute achieved a score higher than 7.0. The conventional jams showed the highest frequency of acceptance (> 80 %) and in purchase intent (> 75 %), indicating a potential for future industrialization and commercialization.

Keywords. *Spondias* spp., processing, sugars, sensory acceptance.

INTRODUÇÃO

A umbu-cajazeira (*Spondias* spp.) é uma árvore silvestre do gênero *Spondias*, pertencente à família Anacardiaceae, característica da região semiárida brasileira. É considerada um híbrido natural entre o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) e a cajazeira (*Spondias mombim* L.), com origem desconhecida e características de planta xerófila com porte elevado e copa aberta ainda em fase de domesticação. Essa espécie é explorada economicamente com base em seu fruto, o umbu-cajá, que é normalmente consumido *in natura* e comercializado em feiras locais e margens de rodovias. Seu fruto apresenta grande aceitação no mercado local, além disso, reúne características favoráveis do umbu, como espessura da polpa e árvore de porte baixo, e do cajá, como aroma e sabor agradáveis¹.

O umbu-cajá é muito consumido no Nordeste brasileiro, entretanto é desconhecido em outras regiões do Brasil. Isso se deve à alta perecibilidade do fruto, que é climatérico, e, portanto, torna importante o processamento do umbu-cajá com o intuito de aumentar sua vida pós-colheita e, assim, disponibilizá-lo a locais mais distantes dos centros produtores. Além de agregar valor à espécie, o processamento do fruto também poderá se constituir em opção de renda para agricultores do Nordeste brasileiro. Neste sentido, a produção de geleias convencionais e dietéticas é uma boa opção para o aproveitamento agroindustrial do umbu-cajá, uma vez que, dentro do segmento de conservas de frutas, o processamento de geleias é um dos setores que mais se expande. A elaboração de geleias de umbu-cajá com e sem a adição de sacarose pode tornar-se mais uma opção de produto no mercado, atendendo às expectativas de consumidores ansiosos por novidades no setor alimentício. A inserção de novos sabores e de produtos para públicos específicos, como é o caso dos dietéticos, no segmento de conserva de frutas pode garantir a permanência da empresa em um mercado cada vez mais competitivo, onde consumidores se preocupam em adquirir produtos saudáveis e com características inovadoras².

Define-se como geleia o produto preparado com frutas e/ou sucos ou extratos aquosos,

podendo apresentar frutas inteiras, partes e/ou pedaços sob variadas formas, devendo tais ingredientes ser misturados com açúcares, com ou sem adição de água, pectina, ácidos e outros ingredientes permitidos. A mistura deve ser convenientemente processada até consistência semi-sólida adequada e, finalmente, acondicionada de forma a assegurar sua perfeita conservação³. Na elaboração de geleias, a pectina é empregada como agente geleificante, espessante e estabilizante. Nas formulações convencionais são utilizadas pectinas de alto teor de metoxilação (ATM), as quais formam géis firmes e estáveis em meios que contenham conteúdo de sólidos solúveis superiores a 50 %⁴, enquanto que em produtos de baixo teor de sólidos solúveis, como os dietéticos, são utilizadas pectinas de baixo teor de metoxilação (BTM), as quais formam géis em presença de íons metálicos bivalentes, normalmente o cálcio, não sendo necessária a presença de açúcares⁵.

Estão disponíveis na literatura diversos estudos envolvendo o processamento de geleias de fruta convencional e de baixo valor calórico, a exemplo de amora-preta⁶, morango⁷, abacaxi⁸, cubiu (*Solanum sessiliflorum*)⁹, gabioba¹⁰, acerola, goiaba¹¹, tomate¹², jabolão¹³, cajá-manga (*S. cytherea*)¹⁴, marmelo 'japonês'¹⁵, manga¹⁶, tamarillo (*Cyphomandra betacea*)¹⁷, *Physalis peruviana*¹⁸, cagaita (*Eugenia dysenterica*)¹⁹, mamão, araçá-boi (*Eugenia stipitata*)²⁰, entre outras. Entretanto, não foram encontradas referências acerca da utilização de umbu-cajá na elaboração desses produtos.

A avaliação das características físico-químicas e microbiológicas de produtos de frutas como a geleia, é indispensável para a avaliação da vida de prateleira do produto, tipo de embalagem a ser acondicionada e condições de conservação. Enquanto os testes sensoriais têm o objetivo de traçar o perfil de aceitabilidade do produto diante dos consumidores.

Considerando-se a necessidade de agregar valor a frutas nativas do semiárido brasileiro, além de inovar no aroma e sabor de produtos já tradicionais como as geleias de frutas, esta pesquisa teve por objetivo desenvolver geleias convencionais e dietéticas de umbu-cajá e avaliar a qualidade sensorial, físico-química e microbiológica dos produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Processamento das geleias

Para realização da pesquisa foram utilizados frutos de umbu-cajá em estágio de maturação completo, sadios, sem manchas e com coloração amarela provenientes do município de Patos/PB (7°1'32" Sul, 37°16'40" Oeste).

Os frutos foram transportados em caixas plásticas, em temperatura ambiente, até o Laboratório de Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas da Universidade Federal de Campina Grande/PB, onde foram selecionados para remoção de frutos injuriados e sujidades, lavados em água corrente e sanitizados em solução clorada (100 ppm) por 15 min. A despolpa foi realizada em despoldadeira horizontal (Laboremus®, modelo DF-200, Brasil), sendo a polpa envasada em sacos de polietileno com capacidade para 500 g e submetida a um congelamento rápido através da imersão em nitrogênio líquido (-196 °C) em botijões criogênicos. Em seguida, as polpas foram estocadas em freezer (-18 °C) até a elaboração das geleias convencionais e dietéticas.

Foram elaboradas quatro formulações de geleias de umbu-cajá, sendo 2 convencionais utilizando açúcar cristal (sacarose) e pectina de Alto Teor de Metoxilação – ATM (Unipeptine®) e 2 dietéticas utilizando aspartame como edulcorante, pectina de Baixo Teor de Metoxilação – BTM (Unipeptine®) como geleificante, cloreto de cálcio para auxiliar na geleificação da pectina e sorbato de potássio como conservante (Plury Chemistry®).

As geleias foram formuladas, sendo: GC1 - geleia convencional (50 % de sacarose e 0,5 % de pectina ATM), GC2 - geleia convencional (55 % de sacarose e 1 % de pectina ATM), GD1 - geleia dietética (0,055 % de aspartame e 1,5 % de pectina BTM) e GD2 - geleia dietética (0,075 % de aspartame e 1,5 % de pectina BTM). As quantidades de sacarose, aspartame e pectina foram pré-estabelecidas após testes preliminares e com base nas legislações vigentes, que estabelecem variação de 50 a 60 % de sacarose³, concentração de aspartame de até

0,075 % para alimentos com substituição total de açúcares²¹ e quantidades suficientes de pectina²² visando obter o efeito desejado em geleias de fruta. Nas geleias dietéticas foram adicionadas ainda 0,1 g/100 g de sorbato de potássio e cloreto de cálcio na quantidade de 55 mg Ca/g de pectina. A polpa de umbu-cajá foi utilizada para balanço total de 100 %, em todas as formulações de geleias.

No processo produtivo das geleias, a polpa de umbu-cajá foi previamente descongelada em geladeira doméstica sob refrigeração (~4 °C). Posteriormente, foi corrigido o pH a polpa de 2,9 para 3,2 com uso de bicarbonato de sódio, com o intuito de se atingir o pH ideal para geleificação da pectina. A seguir, a polpa foi diluída com água potável na proporção de 6:4 m/m (60 % de polpa e 40 % de água). A cocção ocorreu em tacho de aço inoxidável até que as formulações atingissem teores de sólidos solúveis totais (SST) de ~63 °Brix nas geleias convencionais e ~12,50 °Brix (sólido solúvel total da polpa antes da diluição) nas geleias dietéticas, determinados após testes preliminares. O conservante (sorbato de potássio) e o edulcorante (aspartame) foram acrescentados às geleias dietéticas após concentração final dos SST. Em seguida, as geleias convencionais e dietéticas foram envasadas em recipientes de vidro transparentes, previamente aquecidos em água fervente (~100 °C), providos de tampa metálica, invertidas por 10 segundos, ainda quente. As geleias foram resfriadas por imersão em água fria (~20 °C) até atingirem aproximadamente 25 °C e submetidas a testes físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.

Análises físico-químicas

Os testes físico-químicos foram realizados em triplicata e consistiram nas análises de SST e acidez total titulável (ATT) no tempo inicial, logo após o processamento. A análise de SST foi realizada por meio de leitura direta da amostra em refratômetro portátil (Instrutherm®), modelo RT-30ATC, Brasil) e a ATT foi determinada por titulometria, baseada na neutralização da amostra com a solução padronizada de NaOH 0,1 N²³.

Análises microbiológicas

Os coliformes totais foram determinados pela técnica do Número Mais Provável em Caldo Lauril Sulfato, incubado a 35 °C por 48 h. Os tubos positivos foram repicados para Caldo Bile Verde Brilhante para o teste confirmatório. A contagem dos coliformes termotolerantes foi determinada também pela técnica do Número Mais Provável em Caldo EC (Caldo *Escherichia coli*), a partir dos tubos positivos para coliformes totais, incubado a 45,5 °C por 48 h em banho-maria.

Bolores e leveduras foram quantificados pela técnica de plaqueamento, utilizando ágar padrão (*Plate Count Agar* - PCA), incubado a 35 °C por 48 h.

A contagem de *Salmonella* sp. foi realizada em ágar Verde Brilhante (BG) e ágar *Salmonella-Shigella* (SS), inoculados em estrias e incubados a 35-37 °C, por 24 h^{3,24,25}.

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada pela técnica de plaqueamento em superfície (*spread plate*) em ágar Baird Parker (BP), incubado a 35-37 °C, por 48 h.

A contagem das bactérias aeróbias mesófilas foi realizada pela técnica *pour plate* (plaqueamento em profundidade), em ágar Padrão para Contagem (*Plate Count Agar* - PCA), incubado a 35 °C durante 48 h.

A contagem das placas foi realizada com o auxílio do contador de colônias²⁵.

Análise sensorial

A avaliação sensorial das geleias foi realizada após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sob processo CAAE nº 0110.0.133.000-11.

Participaram dos testes, uma equipe de 40 julgadores não treinados, composta por homens e mulheres, com idades variando entre 20 a 59 anos, em sala climatizada (~22 °C). Na ocasião, cerca de 10 g de amostra foram servidas em copos plásticos codificados com três dígitos aleatórios, acompanhadas de bolacha tipo água e sal e água mineral para limpeza do palato. Os testes foram conduzidos em blocos completos, com todas as amostras servidas no início da avaliação aos provadores.

Foi realizado o teste de aceitação²⁶, utilizando-se uma escala hedônica estruturada mista de nove pontos, com escores variando entre 1 (desgostei muitíssimo) e 9 (gostei muitíssimo), em que, de 9 a 6 (acima do ponto médio: aceitação), 5 (ponto médio: indiferença) e de 4 a 1 (abaixo do ponto médio: rejeição). Foram avaliados os atributos sensoriais de cor, aparência, aroma, consistência, sabor, doçura e impressão global.

Com o intuito de avaliar a atitude do consumidor numa situação hipotética de compra das geleias, foi utilizada uma escala estruturada mista de cinco pontos, com escores variando de 1 (certamente não compraria) a 5 (certamente compraria o produto).

Os valores médios dos atributos sensoriais das geleias convencionais e dietéticas de umbu-cajá foram calculados somando-se as notas de todos os julgadores e dividindo-se pelo número de julgadores que participaram dos testes²⁶.

Análise estatística

Na análise estatística dos dados, utilizou-se o programa computacional *Assistat* versão 7.5 beta, por meio de delineamento experimental de blocos inteiramente casualizados com quatro formulações e quarenta repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados das análises de SST e ATT das geleias convencionais e dietéticas de umbu-cajá.

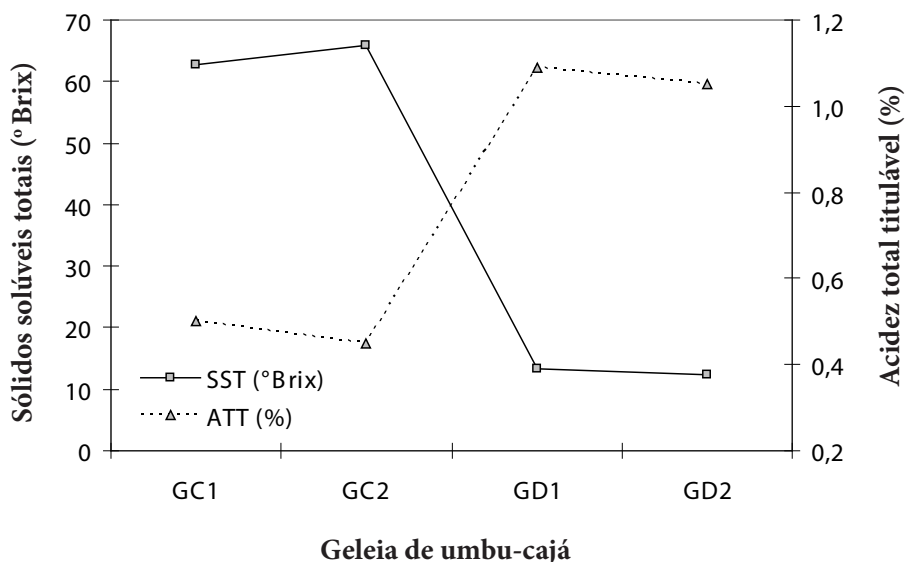
As amostras convencionais apresentaram maior teor de SST, uma vez que foram adicionadas de sacarose comercial. Polesi et al¹⁶ desenvolveram geleias convencionais e dietéticas de manga e também reportaram baixo teor de SST em geleia de baixo valor energético (11 °Brix) e elevado conteúdo de SST na amostra convencional (59 °Brix). As diferenças dos SST entre as amostras de uma mesma categoria (convencional ou dietética)

são, provavelmente, em decorrência da etapa de concentração, que não teve a temperatura controlada. Os valores de ATT foram maiores nas geleias dietéticas, uma vez que estas apresentaram elevada concentração de polpa nas formulações, com valores absolutos de 11,09 e 11,05 % nas amostras GD1 e GD2, respectivamente. O maior conteúdo de polpa pode ter ocasionado concentração de ácidos orgânicos, aumentando a acidez das dessas amostras. Por outro lado, as amostras GC1 e GC2 apresentaram ATT de 0,5 e 0,45 %, respectivamente. Resultados similares foram relatados por Rutz et al¹⁸ ao elaborarem geleias convencionais e de baixo valor energético (*light*) de *P. peruviana*. Os autores reportaram acidez mais elevada nas amostras *light* em comparação às convencionais.

A Tabela 1 apresenta os resultados da avaliação microbiológica das geleias convencionais e dietéticas de umbu-cajá. Todos os parâmetros analisados apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pelas legislações brasileiras^{3,24}, que estabelecem os padrões microbiológicos para geleias de frutas.

Esses resultados indicam que o processamento ocorreu em condições higiênico-sanitárias satisfatórias, assim como a efetividade do tratamento térmico aplicado, o que garante inocuidade dos produtos. Dados que corroboram com Yuyama et al⁹, Tsuchiya et al¹², Prati et al¹¹ e Santos et al⁹, ao avaliarem geleias de cubiu, tomate, goiaba com acerola e cagaita, respectivamente.

Na Tabela 2, estão descritos os valores médios dos atributos sensoriais das geleias convencionais e dietéticas de umbu-cajá. Todos os atributos avaliados apresentaram efeito significativo a 1 % de probabilidade, onde as geleias convencionais tiveram maiores notas que as dietéticas. Isso demonstra que, no processo produtivo, a substituição de sacarose por aspartame prejudica as características sensoriais dos produtos. Observações semelhantes foram reportadas por Silva e Zambiasi⁸ ao avaliarem a aceitabilidade de geleias convencionais e *light* de abacaxi. A geleia elaborada somente com sacarose foi melhor aceita ($p < 0,05$) que o produto substituído por 50 % de edulcorantes (sacarina e ciclamato).



GC1: Geleia convencional (50 % de sacarose); GC2: Geleia convencional (55 % de sacarose); GD1: Geleia dietética (0,055 % de aspartame); GD2: Geleia dietética (0,075 % de aspartame)

Figura 1. Sólidos solúveis totais e acidez total titulável das geleias convencionais (GC) e dietéticas (GD) de umbu-cajá

As geleias adicionadas de sacarose obtiveram escores compreendidos entre 7,15 (doçura) para CG2 e 8,25 (cor) para CG1. Por outro lado, as amostras isentas de sacarose tiveram escores variando de 4,93 (doçura) para GD1 a 7,08 (aroma) para GD2, o que demonstra maior preferência por geleias convencionais adicionadas de sacarose, uma vez que as notas atribuídas aos atributos sensoriais das geleias convencionais foram superiores aos das geleias dietéticas. Este fato pode estar relacionado à aparência mais atrativa dessas geleias convencionais, uma vez que a adição de sacarose aumenta o brilho do produto. As geleias dietéticas geralmente são mais opacas, tornando-se, desse modo, menos atrativas aos consumidores.

Nas geleias dietéticas foi observada a formação de uma estrutura do gel mais frágil e quebradiço. Este aspecto pode ter contribuído negativamente na avaliação sensorial, especialmente para os atributos sensoriais de aparência, consistência e impressão global. Destaca-se que o maior conteúdo dos sólidos solúveis promovidos pela adição de sacarose ocasiona maior força do gel nas geleias convencionais o que favorece uma textura mais firme. Esta característica também contribuiu para os escores mais elevados nessas geleias (Tabela 2), somados a outros atributos como brilho e cor.

Efeitos similares foram constatados por Barcia et al¹³, ao avaliarem geleias convencionais (8,30) e light (5,00 a 7,01) de jambolão. Da mesma forma, Nachtigall et al⁶, ao processarem geleias convencional e light de amora-preta, obtiveram maior escore no produto com 100 % de sacarose (8,70), em comparação às amostras em que a sacarose foi substituída em 50 % pelo edulcorante sucralose (2,97 a 6,39).

As geleias formuladas com sacarose apresentaram maiores escores para o atributo aroma (Tabela 2). Este fato pode estar relacionado ao aroma mais intenso da fruta de origem nas geleias convencionais, que pode ter sido favorecido pela liberação de compostos aromáticos decorrentes da reação de caramelização dos açúcares, apesar de haver menor concentração de polpa de umbu-cajá na formulação GC1 (49,50 %) e GC2 (44,00 %). Ressalta-se que as amostras adicionadas de sacarose tiveram menor tempo de cocção (35-45 min) em relação às amostras acrescidas de aspartame (65-70 min), o que, provavelmente, provocou maior retenção de compostos aromáticos nas geleias convencionais, justificando, também, as maiores notas obtidas pelos julgadores. Dados contraditórios foram verificados por Zambiasi et al⁷, que reportaram maiores escores para o atributo aroma em geleias light quando comparadas às amostras convencionais.

Tabela 1. Resultado das análises microbiológicas das geleias convencionais e dietéticas de umbu-cajá

Parâmetro	GC1	GC2	GD1	GD2
Bolores e leveduras (UFC/g)	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹
<i>Salmonella</i> sp. (UFC/g)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Mesófilos aeróbios (UFC/g)	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹
Coliformes a 35 °C (NMP/g)	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0
Coliformes a 45 °C (NMP/g)	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0

GC1: geleia convencional (50 % de sacarose); GC2: geleia convencional (55 % de sacarose); GD1: geleia dietética (0,05 % de aspartame) e; GD2: geleia dietética (0,075 % de aspartame); UFC: unidades formadoras de colônias; NMP: número mais provável

Tabela 2. Médias dos testes sensoriais afetivo de aceitação e impressão global realizados para as geleias convencionais e dietéticas adicionadas de umbu-cajá

Formulação	Cor	Aparência	Aroma	Consistência	Sabor	Doçura	Impressão global
GC1	8,25 ^a	8,18 ^a	7,73 ^a	7,95 ^a	7,88 ^a	7,75 ^a	8,03 ^a
GC2	8,00 ^a	7,95 ^a	7,60 ^a	7,68 ^a	7,63 ^a	7,15 ^a	7,63 ^a
GD1	6,20 ^b	5,83 ^b	6,63 ^b	6,15 ^b	5,23 ^b	4,93 ^b	5,63 ^b
GD2	6,53 ^b	6,00 ^b	7,08 ^{ab}	6,35 ^b	5,58 ^b	5,40 ^b	6,00 ^b
DMS	0,69	0,77	0,69	0,76	0,88	0,95	0,92
CV (%)	16,46	19,09	16,36	18,53	23,12	25,86	23,12
Teste F	29,91 ^{**}	34,96 ^{**}	7,28 ^{**}	19,63 ^{**}	32,40 ^{**}	27,70 ^{**}	22,53 ^{**}

GC1: geleia convencional (50 % de sacarose); GC2: geleia convencional (55 % de sacarose); GD1: geleia dietética (0,055 % de aspartame) e; GD2: geleia dietética (0,075 % de aspartame); DMS: Desvio médio significativo; CV: Coeficiente de variação; Teste F: F calculado; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente a 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey; **significativo a 1% de probabilidade, pelo Teste F

Tabela 3. Frequências de aceitação, indiferença e rejeição em relação aos atributos sensoriais das geleias convencionais e dietéticas de umbu-cajá

Atributo	Intensidade	Formulação com sacarose		Formulação sem sacarose	
		GC1	GC2	GD1	GD2
Cor	Aceitação (%)	100,0	100,0	70,0	85,0
	Indiferença (%)	0,0	0,0	17,5	10,0
	Rejeição (%)	0,0	0,0	12,5	5,0
Aparência	Aceitação (%)	97,5	95,0	65,0	70,0
	Indiferença (%)	2,5	5,0	7,5	10,0
	Rejeição (%)	0,0	0,0	27,5	20,0
Aroma	Aceitação (%)	97,5	92,5	80,0	92,5
	Indiferença (%)	2,5	7,5	7,5	5,0
	Rejeição (%)	0,0	0,0	12,5	2,5
Consistência	Aceitação (%)	97,5	97,5	72,5	77,5
	Indiferença (%)	2,5	2,5	7,5	12,5
	Rejeição (%)	0,0	0,0	20,0	10,0
Sabor	Aceitação (%)	100,0	95,0	55,0	62,5
	Indiferença (%)	0,0	2,5	7,5	12,5
	Rejeição (%)	0,0	2,5	37,5	25,0
Doçura	Aceitação (%)	97,5	85,0	47,5	55,0
	Indiferença (%)	0,0	2,5	7,5	12,5
	Rejeição (%)	2,5	12,5	45,0	32,5
Impressão global	Aceitação (%)	97,5	95,0	60,0	72,5
	Indiferença (%)	2,5	2,5	12,5	10,0
	Rejeição (%)	0,0	2,5	27,5	17,5

GC1: geleia convencional (50 % de sacarose); GC2: geleia convencional (55 % de sacarose); GD1: geleia dietética (0,055 % de aspartame) e; GD2: geleia dietética (0,075 % de aspartame)

Em relação aos atributos de sabor e doçura, as geleias convencionais apresentaram valores bem superiores aos verificados nas geleias dietéticas. Todavia, deve-se considerar que a ausência de sacarose pode alterar diversas características sensoriais de geleias de frutas, como o sabor e a doçura²⁶, o que também justifica os baixos escores revelados para esses atributos nas geleias sem adição de açúcar. Segundo Benassi et al²⁷, a ausência de sacarose em produtos processados, que normalmente a contém em quantidades elevadas, altera diversas características como sabor, textura, cor e aroma, dificultando a obtenção de produto similar ao convencional. Esse foi outro ponto observado na escolha do edulcorante, uma vez que, de acordo com Cardello et al²⁸, o aspartame possui as características mais próximas ao da sacarose.

As porcentagens de aceitação, indiferença e rejeição atribuídas pelos julgadores das geleias convencionais e dietéticas de umbu-cajá estão apresentadas na Tabela 3.

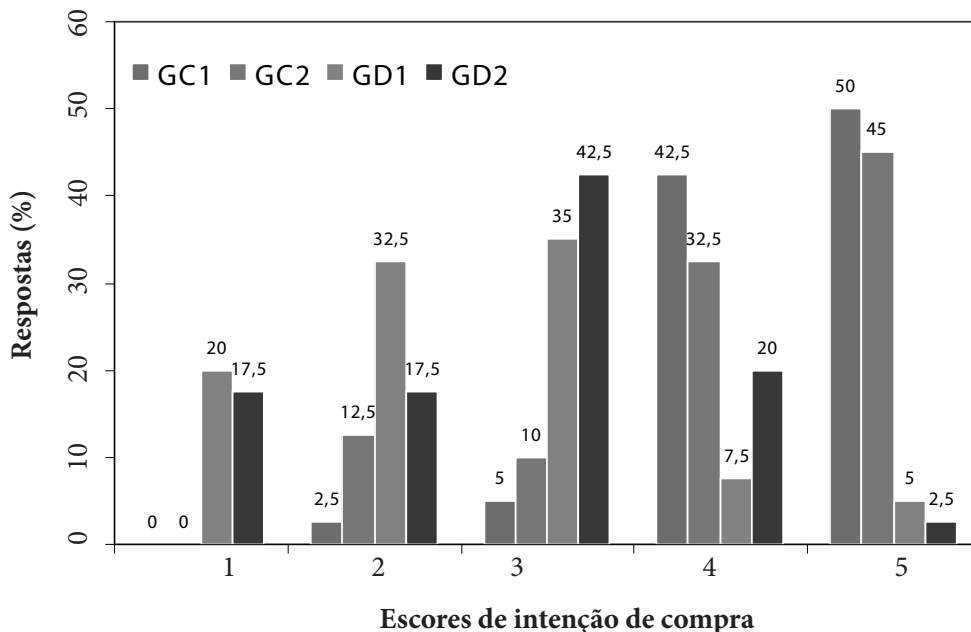
As amostras adicionadas de aspartame apresentaram as maiores frequências de rejeição para todos os atributos avaliados. Dentre estas, a amostra GD1, formulada com a menor concentração de aspartame, revelou os maiores valores absolutos de rejeição, o que evidencia que o aumento do edulcorante reduziu o índice de rejeição por parte dos provadores. Também, deve ser considerado que a maior concentração dos SST, após cocção da amostra GD1 (Figura 1), provavelmente favoreceu a obtenção de produto com sabor ácido mais intenso, o que pode ter repercutido positivamente nos resultados da análise sensorial.

As maiores frequências de aceitação foram obtidas nas geleias convencionais de umbu-cajá, para todos os atributos sensoriais investigados, com valores absolutos superiores a 70 %, o que segundo Dutcosky²⁶, é a porcentagem mínima para que um produto seja considerado aceito, em termos de suas características sensoriais. Dentre essas geleias, a amostra GC1, formulada com as menores concentrações de sacarose e pectina, revelou frequência de aceitabilidade superior a 90 %.

Esse fato pode estar relacionado à textura mais delicada, proporcionada pela menor adição do hidrocolóide e ao sabor frutal mais intenso, já que a formulação foi elaborada com mais polpa. Deve-se salientar, também, que a menor concentração de SST e maior de ATT da amostra GC1 podem ter afetado os resultados, já que a relação SST/ATT estar relacionada à sensação de doçura e, como esta geleia apresentou menor SST e maior ATT, obteve-se menor valor para essa relação (125,22), ou seja, a amostra foi perceptivelmente menos doce, quando comparada com a amostra GC2, que revelou maior SST e menor ATT (145,98). Lago-Vanzela et al¹⁴ desenvolveram geleias convencionais de cajá-manga e também verificaram maior frequência de aceitação para a amostra com menor valor para a relação SST/ATT (67,35). Por outro lado, Pereira et al¹⁵ realizaram análise sensorial em geleias de marmelo 'japonês' em diferentes concentrações de SST e verificaram que a aceitabilidade aumentou com a elevação dos SST das amostras.

Na Figura 2, pode-se verificar a distribuição dos provadores pelos valores hedônicos para a intenção de compra das geleias de umbu-cajá elaboradas com e sem a adição de sacarose.

Analisando-se as fichas de avaliação, verificou-se que mais de 75 % dos provadores assinalaram que provavelmente ou certamente comprariam as geleias convencionais, com destaque para a formulação GC1, que obteve mais de 90 % de intenção de compra positiva (notas entre 4 e 5). Por outro lado, as amostras dietéticas revelaram baixas intenções de compra, com 12,5 % (GD1) e 22,5 % (GD2) das frequências e respostas compreendidas entre os conceitos provavelmente ou certamente comprariam. Para essas geleias, houve grandes níveis de incerteza (notas 3) para a intenção de compra. Esses resultados atestam maior preferência por geleias adicionadas de sacarose, corroborando os dados das Tabelas 2 e 3, e evidenciando potencial mercadológico do



GC1: Geleia convencional (50 % de sacarose); GC2: Geleia convencional (55 % de sacarose);GD1: Geleia dietética (0,055 % de aspartame); GD2:Geleia dietética (0,075 % de aspartame)

Escores: 1: Certamente não compraria; 2: Possivelmente não compraria; 3: Talvez comprasse/Talvez não comprasse; 4: Possivelmente compraria; 5: certamente compraria

Figura 2. Distribuição dos provadores pelos valores hedônicos obtidos na avaliação de intenção de compra das geleias convencionais (GC) e dietéticas (GD)de umbu-cajá

novo produto, inclusive com perspectivas de industrialização e comercialização. Freitas et al¹⁰ avaliaram a aceitabilidade de geleias convencionais de gabioba e constataram intenção e compra positiva inferior aos deste trabalho, com frequências de notas entre 3 e 5 (52,50 %) e 1 e 2 (57,50 %). Guilherme et al¹⁷ desenvolveram geleias convencionais de tamarillo e reportaram frequência de intenção de compra positiva inferior a 50 % (notas entre 2,6 e 3,4), enquanto que Viana et al²⁰ publicaram frequência de resposta positiva de 75 % (notas entre 3 e 5) para geleia convencional formulada com 70 % de mamão e 30 % de araçá-boi, semelhante, portanto, a obtida para as geleias de umbu-cajá elaboradas com sacarose.

CONCLUSÃO

Todas as geleias processadas atenderam aos padrões microbiológicos estabelecidos

pelas legislações vigentes para geleias de frutas. As amostras adicionadas de sacarose apresentaram maior aceitação sensorial e melhor intenção de compra, com destaque para a geleia elaborada com 50 % de sacarose e 0,5 % de pectina, que obteve os melhores resultados absolutos na avaliação sensorial.

A adição de sacarose nas geleias convencionais e a maior concentração de polpa nas geleias dietéticas proporcionaram as mesmas as maiores concentrações de sólidos solúveis totais e acidez, respectivamente.

A utilização de frutos de umbu-cajá mostrou-se viável para processamento de geleias convencionais. Constitui-se em mecanismo de agregação de valor à espécie, com perspectiva de aproveitamento do excedente de produção na época de safra e oferta de um novo produto no mercado de conserva de frutas, além de ser uma opção de renda para agricultores no semiárido brasileiro.

REFERÊNCIAS

1. Fernandes TKS, Figueirêdo RMF, Queiroz AJM, Melo KS, Bezerra MCT. Estudo do comportamento reológico da polpa de umbu-cajá em função da concentração de maltodextrina. *Rev Bras Prod Agroind*. 2008;10(2):171-80.
2. Santos MB, Cardoso RL, Fonseca AAO, Conceição MN. Caracterização e qualidade de frutos de umbu-cajá (*Spondias tuberosa* X *S. mombin*) provenientes do Recôncavo Sul da Bahia. *Rev Bras Frutic*. 2010;32(4):1089-97. [DOI: 10.1590/S0100-29452011005000015].
3. Brasil. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA. Resolução CNNPA n° 12, de 24 de Julho de 1978. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 jul 1978.
4. Nachtigall AM, Zambiasi RC, Carvalho DS. Geleia *light* de hibisco: características físicas e químicas. *Alim Nutr*. 2004;15(2):155-61.
5. Yoo SH, Fishman ML, Hotchkiss Jr AT, Lee HG. Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. *Food Hydrocol*. 2006;20(1):62-7. [DOI: 10.1016/j.foodhyd.2005.03.003].
6. Nachtigall AM, Souza EL, Malgarim MB, Zambiasi RC. Geléias *light* de amora-preta. *Bol CEPPA*. 2004;22(2): 337-54.
7. Zambiasi RC, Chim JF, Bruscatto M. Avaliação das características e estabilidade de geleias *light* de morango. *Alim Nutr*. 2006;17(2):165-70.
8. Silva AFR, Zambiasi RC. Aceitabilidade de geléias convencional e *light* de abacaxi obtidas de resíduos da agroindústria. *Bol CEPPA*. 2008;26(1):1-8.
9. Yuyama LKO, Pantoja L, Maeda RN, Aguiar JPL, Silva SB. Desenvolvimento e aceitabilidade de geleia dietética de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008;28(4):929-34. [DOI: 10.1590/S0101-20612008000400026].
10. Freitas JB, Cândido TLN, Silva MR. Geleia de gabiropa: avaliação da aceitabilidade e características físicas e químicas. *Pesq Agropec Trop*. 2008;38(2):87-94.
11. Prati P, Berbari SAG, Pacheco MTB, Silva MG, Nacazume N. Estabilidade dos componentes funcionais de geleia de yacon, goiaba e acerola, sem adição de açúcares. *Braz J Food Technol*. 2009;12(4):285-94. [DOI: 10.4260/BJFT2009800900023].
12. Tsuchiya AC, Silva AGM, Souza M, Schmidt CAP. Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de geleia de tomate. *Rev Bras Prod Agroind*. 2009;11(2):165-70.
13. Barcia MT, Medina AL, Zambiasi RC. Características físico-químicas e sensoriais de geleias de jambolão. *Bol CEPPA*. 2010;28(1):25-36.
14. Lago-Vanzela ES, Ramin P, Umsza-Guez MA, Santos GV, Gomes E, Silva R. Chemical and sensory characteristics of pulp and peel “cajá-manga” (*Spondias cytherea* Sonn.) jelly. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2011;31(2):398-405. [DOI: 10.1590/S0101-20612011000200018].
15. Pereira GG, Alvarenga AA, Abrahão E, Pinheiro ACM, Oliveira AF, Pio R. Avaliação sensorial de geleia de marmelo ‘Japonês’ em diferentes concentrações de sólidos solúveis totais. *Braz J Food Technol*. 2011;14(3):226-31. [DOI: 10.4260/BJFT2011140300027].
16. Polesi LF, Matta Junior MD, Matsuoka CR, Ceballos CHM, Anjos CBP, Spoto MHF, et al. Caracterização física e química de geleia de manga de baixo valor calórico. *Rev Bras Prod Agroind*. 2011;13(1):85-90.
17. Guilherme PR, Pessatto CC, Zaika WR, Quast E, Quast LB, Ormenese RCSC, et al. Desenvolvimento de geleia de tamarillo contendo polpa integral. *Braz J Food Technol*. 2012;15(2):141-9. [DOI: 10.1590/S1981-67232012005000007].
18. Rutz JK, Voss GB, Jacques AC, Pertuzatti PB, Barcia MT, Zambiasi RC. Geleia de *Physalis peruviana* L.: Caracterização bioativa, antioxidante e sensorial. *Alim Nutr*. 2012;23(3):369-75.

19. Santos PRG, Cardoso LM, Bedetti SF, Hamaceck FR, Moreira AVB, Martino HSD, et al. Geleia de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.): desenvolvimento, caracterização microbiológica, sensorial, química e estudo da estabilidade. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2012;71(2):281-90.
20. Viana ES, Jesus JL, Reis RC, Fonseca MD, Sacramento CK. Caracterização físico-química e sensorial de geleia de mamão com araçá-boi. *Rev Bras Frutic*.2012;34(4):1154-64.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº18, de 24 de março de 2008. Dispõe sobre o “Regulamento técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos”. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 25 mar 2008.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 28, de 26 de maio de 2009. Aprovar a lista de aditivos alimentares, suas funções e seus limites máximos para geleias (de frutas, de vegetais, de mocotó e com informação nutricional complementar de baixo ou reduzido valor energético). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 mai 2009. Seção 1. P 35.
23. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4a ed. [1a ed. Digital]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008. [acesso 2011 Jan 16]. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].
24. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução de Diretoria Colegiada nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan 2001.
25. American Public Health Association - APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: APHA; 2001.
26. Dutcosky SD. Análise sensorial de alimentos. 4a ed. Curitiba: Editora Universitária Champagnat; 2013.
27. Benassi VT, Watanabe E, Lobo AR. Produtos de panificação com conteúdo calórico reduzido. *Bol CEPPA*.2001;19(2):225-42.
28. Cardello HMAB, Silva MAAP, Damásio MH. Análise descritiva quantitativa de edulcorantes em diferentes concentrações. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000;20(3):318-28. [DOI: 10.1590/S0101-20612000000300008].

Propriedades sensoriais e físico-químicas de patê de frango com teor reduzido de sal

Sensory and physical-chemical properties of chicken pate with reduced salt content

RIALA6/1645

Flávia Renata GELINSKI¹, Bruna Magusso RODRIGUES², Lais Maluf HOKAMA², Elisvânia Freitas dos SANTOS², Camila Jordão CANDIDO², Daiana NOVELLO^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). Caixa Postal 35, Guarapuava, PR, Brasil, CEP 85010-000. Tel: 42 3629-8182. E-mail: nutridai@gmail.com

²Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS

Recebido: 24.08.2014 - Aceito para publicação: 20.06.2015

RESUMO

O objetivo deste estudo foi de verificar a aceitabilidade sensorial de patês de frango elaborados com diferentes teores de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e glutamato monossódico (GM) e avaliar a composição físico-química do produto. Na *Etapa 1*, avaliaram-se cinco formulações de patê, com adição de NaCl e KCl (de 0 a 1 %). Na *Etapa 2*, foram avaliadas as mesmas formulações com adição de GM (0,2 %). Na *Etapa 1*, não houve diferença significativa para os atributos aparência, aroma, textura e cor. Contudo, para as características sabor, aceitação global e intenção de compra a amostra contendo KCl (1 %) recebeu menores notas do que aquela sem adição de KCl. Na *Etapa 2*, os produtos apresentaram aumento na aceitabilidade após adição de GM. Foi possível reduzir 75 % de sódio nos patês de frango (NaCl - 0,25 % e KCl - 0,75 %), e obter amostra com aceitação sensorial semelhante ao produto padrão e maior possibilidade de adição de KCl, principalmente em conjunto com o GM.

Palavras-chave. embutidos, sais, carne.

ABSTRACT

This study aimed at assessing the sensory acceptability of chicken pate made with different concentrations of sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl) and monosodium glutamate (MG), and the physical-chemical features of the product were evaluated. In the Step 1, five pate formulations with addition of NaCl and KCl (0 to 1 %) were assessed. The Step 2 analyzed these same formulations but containing MG (0.2 %). In Step 1, no significant difference was found for the attributes appearance, aroma, texture and color. As for taste, overall acceptance and purchase intent characteristics, the sample containing KCl (1 %) received lower scores than that KCl-free formulation. In Step 2, the formulated products showed an increase in the acceptability after adding MG. It was feasible to reduce 75 % of sodium in the chicken pates (NaCl - 0.25 % and KCl - 0.75 %), and to get a sample with the sensory acceptance similar to the standard product, and being achievable to add KCl, specially in conjunction with MG.

Keywords. embedded, salts, meat.

INTRODUÇÃO

Os minerais presentes nos alimentos, como o sódio e potássio, são nutrientes que não podem ser sintetizados pelo organismo e, por isso, devem ser obtidos através da alimentação. São fundamentais como constituintes estruturais dos tecidos e membranas, no controle de impulsos nervosos, atividade muscular, balanço ácido-base do organismo e componentes ou ativadores/reguladores de muitas enzimas¹.

O teor de sódio presente na carne contribui com aproximadamente 20,8 % de sua ingestão diária, o que corresponde a 0,54 g de sódio ou a 1,38 g de sal/dia. Os produtos cárneos são os responsáveis pela maior parte do consumo, enquanto que a carne *in natura* contribui com somente 0,05 g de sódio². A Organização Mundial da Saúde (OMS)³ indica que, a fim de se evitar as doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças renais e hipertensão arterial, um adulto deve ingerir diariamente uma quantidade inferior a 87 mmol/dia de sódio (< 5 g de cloreto de sódio - NaCl/dia e < 2 g de sódio/dia). Atualmente, a *Food Standards Agency* (FSA) desenvolve campanhas com objetivo de reduzir em 50 % o teor de sal em alimentos como bacon e presuntos, 40 % em hambúrgueres e 43 % em salsichas⁴. Diante disso, a fabricação de carnes e produtos cárneos reformulados com teor reduzido de sódio oferece novas oportunidades mercadológicas.

A indústria de carnes no Brasil tem demonstrado um crescimento contínuo nos últimos anos. Os embutidos são os produtos mais consumidos, devido a sua praticidade, acessibilidade, sabor e baixo custo⁵, dentre eles destaca-se o patê. É definido como um produto cárneo industrializado, obtido a partir de carnes, produtos cárneos e miúdos comestíveis das diferentes espécies de animais de açougue. É transformado em massa cárnea, adicionado de ingredientes e submetido a um processo térmico. Pode ter a designação de pasta ou patê, seguido de expressões ou

denominações que o caracterizem de acordo com a sua apresentação para a venda, como exemplo, patê de bacon, peru e de frango, dentre outros⁶. Entretanto, seu teor de sódio pode chegar a até 100 mg/100 g, o que pode aumentar o risco de doenças crônicas não transmissíveis, caso haja um consumo excessivo. Nesse sentido, o patê torna-se um veículo em potencial para o estudo da redução e/ou substituição de NaCl.

Recentemente, os consumidores estão em busca de produtos mais saudáveis e que proporcionem uma boa qualidade de vida⁷. Diante das novas exigências da população e da legislação brasileira, as indústrias têm buscado o desenvolvimento de produtos com melhores propriedades nutricionais, superiores àqueles tradicionalmente comercializados. Nesse contexto, o grande desafio da indústria alimentícia, principalmente a dos produtos cárneos, é o desenvolvimento de alimentos que satisfaçam sensorialmente a expectativa dos consumidores e que apresentem algum benefício fisiológico.

A substituição de ingredientes em produtos reformulados, como a gordura e o sal, por exemplo, podem colaborar para diminuir a associação que os consumidores fazem entre o consumo de produtos cárneos e problemas como a obesidade e a hipertensão⁸. Neste aspecto, a redução no conteúdo de sal dos alimentos, sem ocasionar mudanças na aceitação do consumidor, é muito explorada pela indústria⁹. Outros fatores que interferem no alimento quando se reduz sódio, além da percepção de salinidade, é a intensidade do sabor característico, que pode ser diminuída. Destacam-se também algumas propriedades importantes desempenhadas pelo sal nos produtos cárneos, como sua ação conservante, aumento da capacidade de retenção de água das proteínas, reduzindo as perdas de água durante o armazenamento e o aumento da estabilidade de emulsões, devido à melhor incorporação de gordura na massa⁸. Visando estudar esses efeitos, Wu et al¹⁰ avaliaram as propriedades sensoriais de bacon seco-curado com substituição parcial de NaCl por cloreto de

potássio (KCl) (40 e 70 %). Foi possível reduzir em 40 % o NaCl sem efeitos adversos sobre as propriedades sensoriais e físicas do produto. Entretanto, a substituição de 70 % de NaCl por KCl promoveu um gosto amargo acentuado.

Dentre os principais substitutos do sal em produtos cárneos, destaca-se o KCl, que possui propriedades semelhantes o NaCl e é reconhecido como um ingrediente seguro, podendo ser utilizado sem perda da funcionalidade. Porém, sua adição deve ser restrita, devido às questões relacionadas à possível redução do gosto salgado, introdução de sabores metálicos, amargos e adstringentes, ação de diferentes cátions na atividade enzimática durante o processo de cura e secagem de alimentos cárneos e a falta de quantidade de sal necessária para obter um produto seguro em termos de estabilidade microbiológica¹¹. Segundo Askar et al¹² e Collins¹³, a adição de KCl em produtos cárneos é restringida, principalmente, por seu gosto amargo, sendo o nível de 1 % considerado como o limite máximo de utilização. Assim sendo, o KCl pode ser útil para a redução do teor de sódio em produtos cárneos, o que pode colaborar na reformulação e aceitação dos novos alimentos.

O objetivo deste trabalho foi verificar a aceitabilidade sensorial de patês de frango elaborados com diferentes teores de NaCl, KCl e glutamato monossódico (GM), e avaliar sua composição físico-química.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Os ingredientes básicos utilizados para as formulações foram adquiridos em supermercados do município de Guarapuava, PR. Os sais foram doados por empresas parceiras e apresentavam a seguinte classificação: NaCl (para análise, P.A.), peso molecular 58,44; KCl (P.A.), peso molecular 74,55. O GM utilizado na pesquisa foi um produto comercial, contendo 12.300 mg de sódio/100 g.

Preparo das formulações

O preparo dos patês foi realizado no Laboratório de Técnica e Dietética do curso de Nutrição da UNICENTRO. Os ingredientes utilizados para a formulação base foram: 48,06 % de peito de frango; 38,45 % de creme de leite; 9,61 % de ricota; 0,96 % de salsinha e; 1,92 % de caldo de galinha.

Para o preparo dos patês de frango, inicialmente foi realizada a limpeza do peito de frango, retirando-se toda a gordura visível. Em seguida, foi cozido em água fervente (1 L) com orégano e folhas de louro (5 g), por aproximadamente 30 min. Logo após, foi reservado até atingir temperatura e 20 °C e desfiado manualmente. Em liquidificador (Arno®, Brasil), foram adicionados frango desfiado, o creme de leite, a ricota, a salsinha e o caldo de galinha (diluído em 30 mL de água), sendo a mistura batida por 3 min em velocidade média.

Finalizada a massa de patê base, a mesma foi separada em 5 formulações para adição dos sais, conforme descrito em cada etapa: *Etapa 1* - foram elaboradas 5 formulações de patê de frango com diferentes teores de NaCl e KCl sendo: F1 (1 % de NaCl), F2 (0,75 % de NaCl e 0,25 % de KCl), F3 (0,50 % de NaCl e 0,50 % de KCl), F4 (0,25 % de NaCl e 0,75 % de KCl) e F5 (1 % de KCl). *Etapa 2* - utilizou-se basicamente as mesmas porcentagens de adição de sais da *Etapa 1*, porém foram acrescentadas a cada amostra o realçador de sabor GM na porcentagem de 0,20 %, totalizando-se 5 formulações: F1 (1 % de NaCl + 0,20 % de GM), F2 (0,75 % de NaCl e 0,25 % de KCl + 0,20 % de GM), F3 (0,50 % de NaCl e 0,50 % de KCl + 0,20 % de GM), F4 (0,25 % de NaCl e 0,75 % de KCl + 0,20 % de GM) e F5 (1 % de KCl + 0,20 % de GM). Os níveis de adição estabelecidas nas *Etapas 1* e *2* foram definidos através de testes sensoriais preliminares realizados com o produto.

Após a adição dos sais, os ingredientes foram misturados com o auxílio de um liquidificador (Arno®, Brasil), por

aproximadamente 5 min, até se obter uma massa homogênea. As formulações foram embaladas em sacos plásticos de polietileno, permanecendo em descanso por 15 min em geladeira (Brastemp®, Brasil), sob temperatura de 8 °C.

Análise Sensorial

A avaliação sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO, em cabines individuais e com iluminação de cor branca. Participaram da pesquisa 264 consumidores (66 indivíduos em cada teste sensorial), sendo estudantes e funcionários do campus CEDETEG de ambos os gêneros, com idade entre 17 e 25 anos, todos consumidores habituais de patê.

Foram avaliados os atributos aparência, aroma, sabor, sabor residual, textura e cor. As amostras foram analisadas através de uma escala hedônica estruturada de 9 pontos, variando de desgostei muitíssimo (nota 1) a gostei muitíssimo (nota 9). Foram aplicadas também questões de aceitação global com auxílio de escala hedônica estruturada de 9 pontos e intenção de compra, utilizando-se uma escala estruturada de 5 pontos (1: certamente não compraria, 5: certamente compraria)¹⁴.

Os consumidores receberam uma porção de cada amostra (aproximadamente 10 g), em copos plásticos brancos codificados com números de três dígitos, de forma balanceada, acompanhada de água para realização do branco. As formulações foram oferecidas aos consumidores de forma monádica sequencial.

O teste de ordenação foi aplicado tanto para a *Etapa 1* como a *Etapa 2* para comparar as diferenças das amostras em atributo específico de gosto salgado, já que os patês foram reduzidos em sódio. Os provadores (132) classificaram as amostras em ordem crescente de gosto salgado, sendo da menos salgada para a mais salgada¹⁴.

Índice de aceitabilidade (IA)

O cálculo do índice de aceitabilidade das formulações foi realizado, segundo a fórmula: $IA (\%) = A/B \times 100$, sendo A = nota média obtida para o produto; B = nota máxima dada ao produto¹⁴.

Composição físico-química

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO e no Laboratório de Físico-Química da Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública (UTASP) da UFMS.

As seguintes determinações foram realizadas, em triplicata, na formulação padrão (100 % de NaCl) dos patês de frango: *Umidade*: foi determinada em estufa a 105 °C até peso constante¹⁵; *Cinzas*: foram analisadas em mufla (550 °C)¹⁵; *Lipídios totais*: utilizou-se o método de extração a frio¹⁶. *Proteínas*: foram avaliadas através do teor de nitrogênio total da amostra, pelo método *Kjeldahl*, determinado ao nível semimicro¹⁵. Utilizou-se o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25; *Fibra Alimentar*: foi realizado o cálculo teórico das formulações através do programa *Avanutri*® (Versão .5.111); *Carboidratos*: foi realizada através de cálculo teórico (por diferença) nos resultados das triplicatas, conforme a fórmula: $\% \text{ Carboidratos} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ fibra})$; *Valor calórico*: o total de calorias (kcal) foi calculado utilizando-se os seguintes valores: lipídios (9,03 kcal/g), proteína (4,27 kcal/g) e carboidratos (3,82 kcal/g)¹⁷.

Para a determinação dos teores de sódio e potássio das formulações (*Etapas 1 e 2*), as amostras foram inicialmente submetidas à incineração em mufla (550 °C), através do método da AOAC¹⁵. Em seguida, passaram por digestão em ácido nítrico, sendo diluídas para análise. A quantificação foi realizada em analisador automatizado (Roche® Hitache, Modelo Cobas 6.000, Tokyo, Japão).

Determinação do Valor Diário de Referência (VD)

O VD foi calculado em relação a 10 g da amostra, com base nos valores médios preconizados para adultos (17 a 25 anos)¹⁸, resultando em: 1.971,31 kcal/dia, 255,28 g/dia de carboidratos, 70,28 g/dia de proteínas, 71,46 g/dia de lipídios e 13,69 g/dia de fibra alimentar. O VD para os micronutrientes foi calculado considerando 2.000 mg/dia³ de sódio e 2.398,39 mg/dia de potássio¹⁸.

Análise estatística

Os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste de Tukey para comparação de médias. Na análise sensorial foram empregados também o Teste de Friedman e a Tabela de Christensen, que indicaram a diferença mínima significativa (DMS) entre as amostras testadas e o número de julgamentos obtidos no teste de ordenação¹⁴. Todos os testes foram analisados em nível de 5 % de significância, com auxílio do *software Statgraphics plus*®, versão 5.1.

Questões éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICENTRO, parecer nº 345.569/2013. Entretanto, como critérios de exclusão foram considerados os seguintes fatores: possuir alergia a algum ingrediente utilizado na elaboração dos patês de frango, aqueles que não aceitaram participar da pesquisa e/ou que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Sensorial

Na Tabela 1 encontram-se os IA's e as médias dos testes sensorial afetivo, de intenção de compra e de ordenação dos patês de frango formulados na *Etapa 1 e 2*.

Na *Etapa 1*, não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações para os atributos aparência, aroma, textura e cor. Efeitos semelhantes foram observados por Barbosa¹⁹, que avaliou a substituição de NaCl

por KCl (45, 50 e 55 %) em salames tipo hamburguês. Segundo explicam Paulsen et al²⁰, geralmente, a adição de KCl em produtos alimentícios intervém de forma mais marcante no sabor, afetando discretamente atributos como a aparência, aroma, textura e cor.

Para os atributos sabor, aceitação global e intenção de compra a amostra F5 (100 % de KCl) recebeu a menor nota pelos provadores comparada a F1. As demais formulações não apresentaram diferença estatística entre si. Em estudos de Wu et al¹⁰, que avaliaram a substituição de sódio (40 a 70 % de NaCl por KCl) em bacon seco-curado, foi observada maior rejeição já com adições menores de KCl (40 %). Segundo os autores, a baixa aceitação dos produtos com maiores teores de KCl se deve ao gosto amargo produzido por esse sal. Outra explicação pode ser pelo fato do sódio possuir mecanismos específicos que envolvem os canais epiteliais, em que um deles é exclusivo para o sódio, sendo responsável pelo gosto salgado; outro canal é exclusivo para os demais minerais, o qual não tem função de identificar o gosto salgado, podendo desencadear outros tipos de sabores²¹. Dessa forma, quantidade de KCl adicionada deve ser limitada.

Na *Etapa 2*, de forma similar, não houve diferença significativa entre as amostras para os atributos aparência, aroma, textura e cor. Entretanto, diferente da *Etapa 1*, não foi verificada diferença estatística também quanto à aceitação global, o que demonstra que a adição de GM promoveu uma melhor aceitação do produto. Além disso, a utilização do realçador de sabor melhorou a aceitação dos atributos sabor, sabor residual e intenção de compra, visto que F1, F2 e F3 apresentaram notas maiores que F5 nestas avaliações. Destaca-se que, em geral, houve um aumento na aceitabilidade de todas as formulações com a adição de GM em relação à *Etapa 1*. Segundo Carvalho et al²², esse fato pode ser explicado, pois o gosto "umami", característico do GM, melhora o sabor dos alimentos. Também, permite que ele seja utilizado como substituinte do NaCl, reduzindo seu uso entre 30 e 40 % nos alimentos sem afetar significativamente o paladar.

Tabela 1. Índices de aceitabilidade (IA) e médias dos testes sensorial afetivo, de intenção de compra e de ordenação (gosto salgado) realizados para as formulações de patê de frango adicionadas de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e glutamato monossódico (GM)

Amostras/ Atributos	F1 Média	F2 Média	F3 Média	F4 Média	F5 Média
Etapa 1					
Aparência	7,28 ^a	7,00 ^a	7,39 ^a	7,23 ^a	7,33 ^a
IA (%)	80,88	77,77	82,11	80,33	81,44
Aroma	7,20 ^a	7,32 ^a	7,33 ^a	7,25 ^a	7,21 ^a
IA (%)	80,00	81,33	81,44	80,55	80,11
Sabor	7,49 ^a	7,21 ^{ab}	7,27 ^{ab}	7,20 ^{ab}	6,74 ^b
IA (%)	83,22	80,11	80,77	80,00	74,88
Sabor residual	6,98 ^a	6,98 ^a	7,00 ^a	6,65 ^{ab}	6,09 ^b
IA (%)	77,55	77,55	77,77	73,88	67,66
Textura	7,11 ^a	7,13 ^a	7,36 ^a	7,19 ^a	7,46 ^a
IA (%)	79,00	79,22	81,77	79,88	82,88
Cor	7,29 ^a	7,29 ^a	7,43 ^a	7,34 ^a	7,49 ^a
IA (%)	81,00	81,00	82,55	81,55	83,22
Aceitação Global	7,38 ^a	7,10 ^{ab}	7,06 ^{ab}	6,91 ^{ab}	6,47 ^b
IA (%)	82,00	78,88	78,44	76,77	71,88
Intenção de Compra	4,02 ^a	3,73 ^{ab}	3,75 ^{ab}	3,59 ^{ab}	3,25 ^b
IA (%)	80,40	74,60	75,00	71,80	65,00
Somatório de notas*	291 ^a	276 ^a	220 ^b	198 ^b	155 ^c
Etapa 2					
Aparência	7,37 ^a	7,19 ^a	7,27 ^a	7,04 ^a	7,15 ^a
IA (%)	81,88	79,88	80,77	78,22	79,44
Aroma	7,29 ^a	7,12 ^a	7,04 ^a	7,01 ^a	7,01 ^a
IA (%)	81,00	79,11	78,22	77,88	77,88
Sabor	7,39	7,42 ^a	7,38 ^a	7,26 ^{ab}	6,85 ^b
IA (%)	82,11	82,44	82,00	90,75	76,11
Sabor residual	7,17 ^a	7,18 ^a	7,20 ^a	6,79 ^{ab}	6,35 ^b
IA (%)	79,66	79,77	80,00	75,44	70,55
Textura	7,21 ^a	7,16 ^a	7,29 ^a	7,15 ^a	7,31 ^a
IA (%)	80,11	79,55	81,00	79,44	81,22
Cor	7,26 ^a	7,25 ^a	7,35 ^a	7,27 ^a	7,35 ^a
IA (%)	80,66	80,55	81,66	80,77	81,66
Aceitação Global	7,46 ^a	7,26 ^a	7,39 ^a	7,19 ^a	7,12 ^a
IA (%)	82,88	80,66	82,11	79,88	79,11
Intenção de Compra	4,08 ^a	4,02 ^a	3,97 ^a	3,73 ^{ab}	3,37 ^b
IA (%)	81,60	80,40	79,40	74,60	67,40
Somatório de notas*	271 ^a	270 ^a	189 ^b	202 ^b	178 ^b

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); *Etapa 1*: F1 (1 % de NaCl), F2 (0,75 % de NaCl e 0,25 % de KCl), F3 (0,50 % de NaCl e 0,50 % de KCl), F4 (0,25 % de NaCl e 0,75 % de KCl) e F5 (1 % de KCl); *Etapa 2*: F1 (1 % de NaCl + 0,20 % de GM), F2 (0,75 % de NaCl e 0,25 % de KCl + 0,20 % de GM), F3 (0,50 % de NaCl e 0,50 % de KCl + 0,20 % de GM), F4 (0,25 % de NaCl e 0,75 % de KCl + 0,20 % de GM) e F5 (1 % de KCl + 0,20 % de GM); *Diferença mínima significativa (DMS) entre as amostras com valor ≥ 35 apresentam diferença estatística ($p < 0,05$), segundo a Tabela de Christensen¹⁴ para 66 julgamentos e 5 amostras

No teste de ordenação (*Etapa 1*), as formulações relatadas como mais salgadas foram F1 e F2, seguidas de F3 e F4. A amostra F5 foi classificada como a menos salgada ($p < 0,05$). Já na *Etapa 2*, foi possível melhorar a percepção do gosto salgado para a formulação F5, não apresentando diferença estatística de F3 e F4. Conforme McGough et al²³, o realçador de sabor GM pode aumentar a percepção do NaCl, elevando assim o gosto salgado do alimento. Também, Carvalho et al²² explicam que o GM pode proporcionar a redução do gosto amargo do KCl, melhorando o sabor.

As formulações F1, F2, F3 e F4 atingiram IA's acima de 70 % em todos os atributos, o qual considera os produtos com boa aceitação sensorial¹⁴. Entretanto, F5 permaneceu abaixo deste índice para os atributos sabor residual e intenção de compra (*Etapa 1*). Após a adição de GM (*Etapa 2*), em geral, foi possível elevar os IA's das amostras, elevando-se dessa forma a aceitação pelos provadores. Destaca-se que apenas no teste de intenção de compra não foi possível atingir um IA acima de 70 % (F5). Esses altos IA's, para a maioria das formulações, demonstram a viabilidade de redução de sódio em produtos cárneos reformulados como o patê de frango, incentivando os bons hábitos alimentares e redução de doenças crônicas não transmissíveis²⁴.

Nas Figuras 1 e 2, está representada a distribuição dos provadores pelos valores hedônicos obtidos na avaliação dos atributos aparência, aroma, sabor, textura, cor, sabor residual e aceitação global das formulações nas *Etapas 1 e 2* respectivamente.

Em geral, na *Etapa 1* a maioria dos provadores julgou as amostras entre as notas 7 ("gostei moderadamente") e 8 ("gostei muito"), o que demonstra boa aceitação dos patês de frango com teor reduzido de sódio. Destaca-se, porém, a menor porcentagem de aceitação para as formulações F4 e F5, o que confirma a menor aceitação dos produtos com maior teor de KCl. Segundo Aliño et al¹¹, sua utilização deve ser restrita devido à possível redução do gosto salgado do produto e a introdução de sabores metálicos, amargos e adstringentes.

A adição de GM (*Etapa 2*) aos patês promoveu uma maior aceitação dos produtos, concentrando as notas, em sua maioria acima de 6 ("gostei ligeiramente") em todos os atributos e formulações. Resultados que corroboram com Santos et al²⁵, que utilizaram 0,6 % de GM em salsichas. Conforme Bellisle²⁶, o GM possui características que proporcionam aumento da salinidade nos produtos, fato que melhora o sabor metálico de alguns metais, como o potássio, produzindo uma resposta neural semelhante ao do NaCl.

Composição físico-química

Por meio da Tabela 2, observa-se a composição físico-química e valores diários recomendados (VD) do patê de frango padrão (100 % de NaCl) comparados com um produto comercial.

O produto comercial de referência apresentou teores mais elevados de lipídios e calorias e menores de proteínas e carboidratos com relação ao patê formulado. Segundo a Instrução Normativa nº 21/MAPA, que trata sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Patê⁶, os teores de umidade, carboidratos, proteínas e lipídios devem ser no máximo 70, 10, 8 e 32 %, respectivamente. Dessa forma, todos os nutrientes do produto avaliado estão conforme a legislação vigente. Destaca-se que o elevado teor de proteínas do patê é benéfico aos consumidores, uma vez que fornece aminoácidos essenciais, os quais não são sintetizados pelo organismo²⁷. A Tabela 3 apresenta os teores médios de sódio e potássio e VD das formulações de patê de frango.

Sabendo-se que o patê da amostra F4 (*Etapa 1 e 2*) obteve melhor aceitação sensorial (Tabela 1), isso é maior teor de adição de KCl e aceitação semelhante ao padrão, foi possível uma redução média de 75 % de sódio em relação ao padrão. Resultados que corroboram com Santos et al²⁵, que avaliaram salsichas cozidas com substituição de NaCl (25 a 75 %) por KCl, GM (0,06 %) e outros sais, em que foi possível observar uma redução de 68 % de sódio sem interferir no sabor dos produtos.

Tabela 2. Composição físico-química e valores diários recomendados – VD* (porção média de 10 gramas) de patê de frango (padrão, 100% de NaCl) comparado com um produto comercial**

Avaliação	Média ± DP	VD (%)*	Referência**
Umidade (%)	69,90 ± 0,02	ND	ND
Cinzas (g.100 g ⁻¹)***	2,52 ± 0,04	ND	ND
Proteínas (g.100 g ⁻¹)***	14,29 ± 0,04	2,19	9,00
Lipídios (g.100 g ⁻¹)***	8,50 ± 0,02	1,27	21,00
Carboidratos (g.100 g ⁻¹)***	4,85 ± 0,32	0,22	0,00
Calorias (kcal.100 g ⁻¹)***	156,05 ± 0,78	0,89	230,00
Fibra alimentar (g.100g ⁻¹)****	0,00	0,00	0,00

*VD: nutrientes avaliados pela média da DRI¹⁸, com base numa dieta de 1.971,31 kcal/ dia; **Valores comparados com patê de frango vendido comercialmente (marca líder); **Valores calculados em base úmida; ****Cálculo teórico; DP: desvio padrão da média; ND: Não disponível

Tabela 3. Teores médios e valores diários recomendados – VD* (porção média de 10 gramas) de sódio (Na) e potássio (K) das formulações de patê de frango – *Etapas 1 e 2*

Amostras/ Atributos	F1 (mg/100g)	VD (%)	F2 (mg/100g)	VD (%)	F3 (mg/100g)	VD (%)	F4 (mg/100g)	VD (%)	F5 (mg/100g)	VD (%)
<i>Etapa 1</i>										
Na	882,38	4,41	782,38	3,91	682,38	3,41	582,38	2,91	482,38	2,41
% redução	0,00		11,33		22,67		34,00		45,33	
K	192,97	0,80	323,85	1,35	454,72	1,89	585,60	2,44	716,47	2,98
% aumento	0,00		67,82		135,64		203,46		271,29	
<i>Etapa 2</i>										
Na	906,98	4,53	806,98	4,03	706,98	3,53	606,98	3,03	506,98	2,53
% aumento/ redução**	2,79		8,55		19,88		31,21		42,54	

*VD: nutrientes avaliados pela média de valor diário, com base numa dieta de 2.000 mg/ dia de sódio³ e 2.398,39 mg/ dia de potássio¹⁸; **Referente ao total de Na da *Etapa 1*; *Etapa 1*: F1 (1 % de NaCl), F2 (0,75 % de NaCl e 0,25 % de KCl), F3 (0,50 % de NaCl e 0,50 % de KCl), F4 (0,25 % de NaCl e 0,75 % de KCl) e F5 (1 % de KCl); *Etapa 2*: F1 (1 % de NaCl + 0,20 % de GM), F2 (0,75 % de NaCl e 0,25 % de KCl + 0,20 % de GM), F3 (0,50 % de NaCl e 0,50 % de KCl + 0,20 % de GM), F4 (0,25 % de NaCl e 0,75 % de KCl + 0,20 % de GM) e F5 (1 % de KCl + 0,20 % de GM)

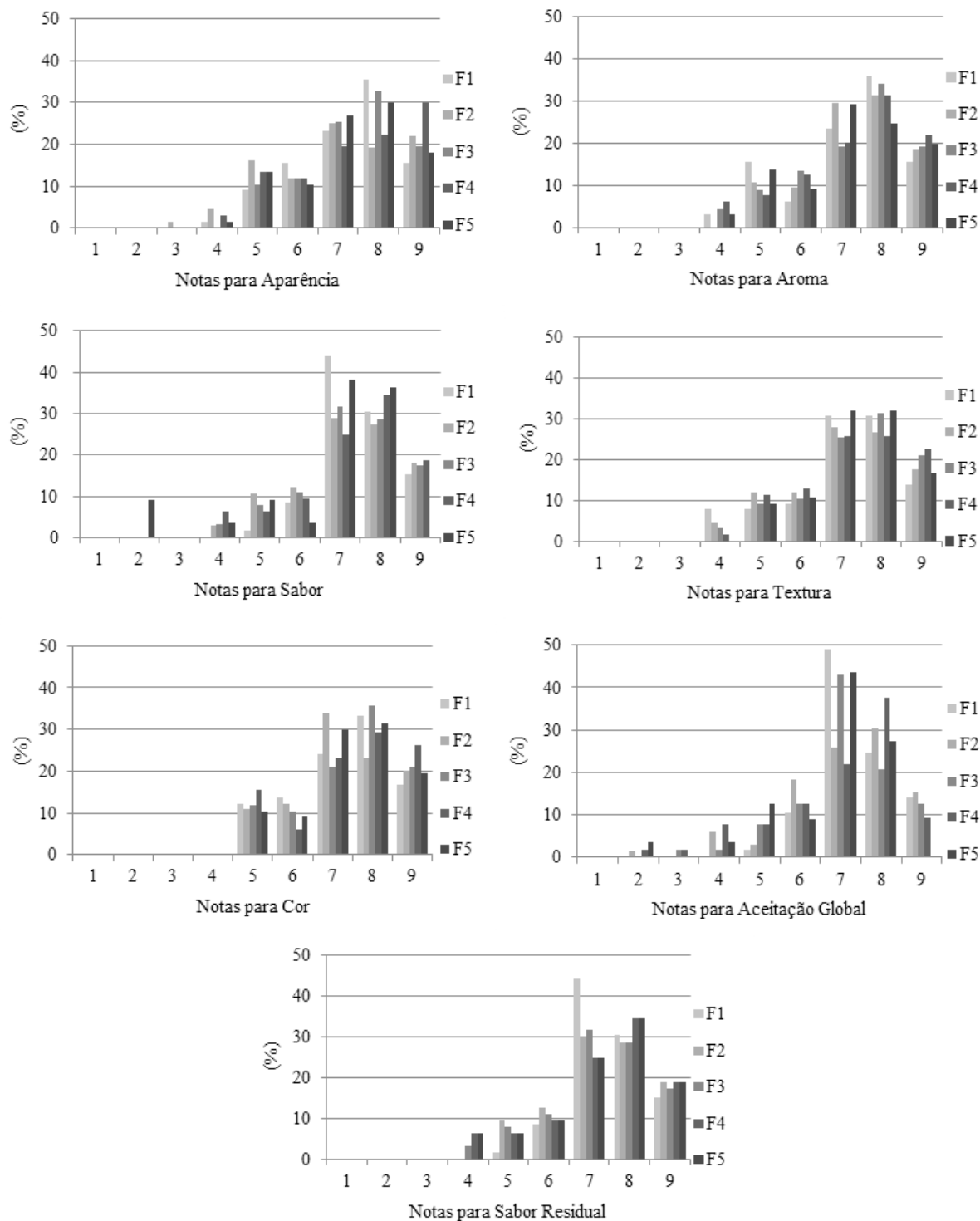


Figura 1. Distribuição dos provadores pelos valores hedônicos obtidos na avaliação sensorial das formulações de patês de frango com teor reduzido de cloreto de sódio da *Etapa 1*

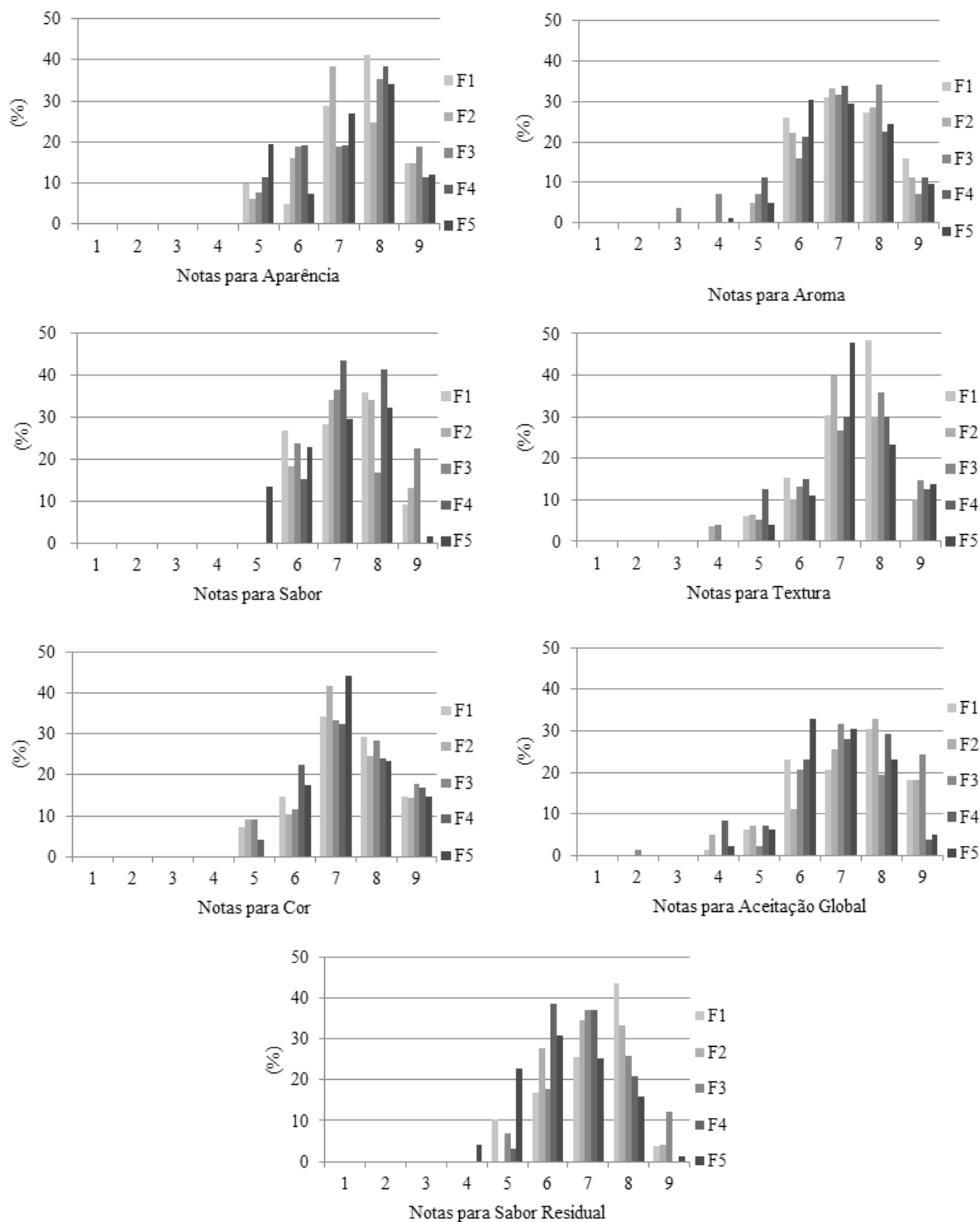


Figura 2. Distribuição dos provadores pelos valores hedônicos obtidos na avaliação sensorial das formulações de patês de frango com teor reduzido de cloreto de sódio da *Etapa 2*

CONCLUSÃO

Foi possível reduzir o teor de NaCl e elevar o conteúdo de KCl nas formulações de patês de frango sem interferir na aceitação sensorial com um nível de adição de até 0,75 % de KCl (redução de 75 % de NaCl).

A adição de GM elevou, em geral, a aceitação dos produtos. Assim sendo, é possível restringir o teor de NaCl em patês de frango, principalmente através de sua utilização em conjunto com o KCl e GM.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UNICENTRO pela concessão da bolsa (Programa de Iniciação Científica).

REFERÊNCIAS

1. Fiorini SL. Dossiê: Fibras alimentares. *Revista-Fi Food Ingredients Brasil*. nº 3, 2008. [acesso 2014 Jun 11]. Disponível em: [http://www.revista-fi.com/materias/63.pdf].
2. Guárdia MD, Guerrero L, Gelabert J, Gou P, Arnau J. Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Sci*.2006;73(3):484-90. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.01.009].
3. World Health Organization – WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: World Health Organization; 2003. (Technical report series n. 916) [acesso 2014 Ago 21]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916.pdf].
4. Nascimento DR, Campagnol BCP, Monteiro SE, Pollonio RAM. Substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio: influência sobre as características físico-químicas e sensoriais de salsichas. *Alim Nutr*. 2007;18(3):297-302.
5. Gonçalves JR, Silveira ETF, Yamada EA. Considerações sobre a utilização da pré-mistura no processamento de embutidos cárneos emulsionados. *Colet Inst Tecnol Aliment*. 1995;25(3):1-7.
6. Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução normativa nº 21 de 31 de julho de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Patê, de Bacon ou Barriga Defumada e de Lombo Suíno. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 03 ago. 2000. Seção 1, página12.
7. Murphy SC, Gilroy D, Kerry JE, Buckley DJ, Kerry JP. Evaluation of surimi, fat and water content in a low/no added pork sausage formulation using response surface methodology. *Meat Sci*.2004;66(3):689-701. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2003.07.001].
8. Nascimento R, Campagnol PCB, Monteiro ES, Pollonio MAR. Substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio: Influência sobre as características físico-químicas e sensoriais de salsichas. *Alim Nutr*. 2007;18(3):297-302.
9. Lawrence G, Salles C, Septier C, Busch J, Thomas-Danguin T. Odour-taste interactions: a way to enhance saltiness in low-salt content solutions. *Food Qual Prefer*.2009;20(3):241-8. [DOI: 10.1016/j.foodqual.2008.10.004].
10. Wu W, Zhang Y, Long M, Tang J, Yu X, Wang J, et al. Proteolysis and sensory properties of dry-cured bacon as affected by the partial substitution of sodium chloride with potassium chloride. *Meat Sci*. 2014;96(3):1325-31. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.10.037].
11. Aliño M, Grau R, Toldrá F, Blesa E, Pagán MJ, Barat JM. Influence of sodium replacement on physicochemical properties of dry-cured loin. *Meat Sci*.2009; 83(3):423-30. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.06.022].
12. Askar SK, El-Samahy SK, Tawfik M. The effect of substituting KCl and K-lactate for sodium chloride. *Fleischwirtschaft*.1994;73(3):289-92.
13. Collins JE. Reducing salt (sodium) levels in process meat poultry and fish products. *In: Pearson AM, Dutson TR. (Ed.) Advances in meat research: production and processing of healthy meat, poultry and fish products*. London: Blackie Academic & Professional; 1997.
14. Dutcosky SD. *Análise Sensorial de Alimentos*. 3ª ed. Curitiba: Champagnat; 2011.
15. *Official Methods of Analysis of AOAC International – AOAC*. 18th Edition. 4 rev. Gaithersburg, MD: AOAC; 2011.

16. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*.1959;37(8):911-7. [DOI: 10.1139/o59-099].
17. Merrill AL, Watt BK. Energy value of foods: basis and derivation. Department of Agriculture Handbook n° 74. Washington, DC, USA: Agricultural Research Service; 1973.
18. Dietary Reference Intakes (DRI). Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Washington, DC: The National Academies Press; 2005.
19. Barbosa RG. Fabricação de salame tipo hamburguês com substituição parcial de sódio [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2009.
20. Paulsen TM, Nys A, Kvarberg R, Hersleth M. Effect of NaCl substitution on the sensory properties of sausages: temporal aspects. *Meat Sci*.2014;98(1):164-70. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.05.020].
21. Liem DG, Miremedi F, Keast RSJ. Reducing sodium in foods: the effect on flavor. *Nutrients*.2011;3(6):694-711. [DOI: 10.3390/nu3060694].
22. Carvalho PRRM, Bolognesi VJ, Barreira SMW, Garcia CER. Características e segurança do glutamato monossódico como aditivo alimentar: artigo de revisão. *Vis Acad*.2011;12(1):53-64. [DOI: 10.5380/acd.v12i1.22025].
23. McGough MM, Sato T, Rankin SA, Sindelar JJ. Reducing sodium levels in frankfurters using a natural flavor enhancer. *Meat Sci*.2012;91(2):185-94. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.01.018].
24. Sociedade Brasileira de Cardiologia – Departamento de Hipertensão Arterial. Consensos e Diretrizes. 2011. [acesso 2014 Jul 02]. Disponível em: [<http://departamentos.cardiol.br/dha/consenso3/tratamento.asp>].
25. Santos BA, Campagnol PCB, Morgano MA, Pollonio MAR. Monosodium glutamate, disodium inosinate, disodium guanylate, lysine and taurine improve the sensory quality of fermented cooked sausages with 50 % and 75 % replacement of NaCl with KCl. *Meat Sci*.2013;96(1):1-22. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.08.024].
26. Bellisle F. Glutamate and the UMAMI taste: sensory, metabolic, nutritional and behavioural considerations. A review of the literature published in the last 10 years. *Neuroscind Biobehav Rev*.1999;23(3):423-38.
27. Pinheiro MD, Porto ARK, Menezes SEM. A química dos alimentos: carboidratos, lipídios, proteínas e minerais. Maceió: EDUFAL; 2005.

Formação de biofilmes de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga sorotipos O153:H25, O113:H21 e O111:H8 em superfície de aço inoxidável e eficácia de sanitizante

Biofilm formation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 and O111:H8 on the stainless steel surface and the effectiveness of sanitizer

RIALA6/1646

Paulo Gomes de LIMA^{1*}, Julia do Prado Lima Guimarães CABRAL², Thalita Martins da SILVA², Luciana Maria Ramires ESPER², Alice Gonçalves Martins GONZALEZ², Robson Maia FRANCO¹

*Endereço para correspondência: ¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil Filho, 64, Niterói, RJ, Brasil, CEP: 24230-000. Tel: 21 3674-7333. E-mail: pglima@id.uff.br

²Departamento de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, UFF, Niterói, RJ, Brasil

Recebido: 07.11.2014 - Aceito para publicação: 14.05.2015

RESUMO

Neste estudo as cepas de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) O153:H25, O113:H21 e O111:H8, isoladas de rebanhos do país, foram avaliadas quanto à capacidade de formar biofilmes em superfície de aço inoxidável utilizada na indústria de alimentos, bem como a eficácia de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na inativação desses biofilmes. A capacidade de formação de biofilme foi detectada em todas as cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga. Na avaliação da eficácia do sanitizante hipoclorito de sódio, nas concentrações de 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹, observou-se a redução a <1 log UFC/cm² em todas as cepas e nos tempos avaliados. Estes dados reforçam a importância do correto procedimento de higienização, uma vez que biofilmes podem tornar-se importantes fontes de contaminação no ambiente de produção de alimentos.

Palavras-chave. STEC não-O157, biofilmes, toxina shiga, aço inoxidável.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the biofilm formation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 and O111:H8 (STEC non-O157), isolated from Brazilian cattle, on the stainless steel surface, and also the efficacy of different concentrations of sodium hypochlorite for inactivating these biofilms. The ability to form biofilm was demonstrated in all of Shiga toxin-producing *E. coli* strains. In assessing the effectiveness of sodium hypochlorite sanitizer, a reduction to <1 log CFU/cm² was observed in all of the evaluated strains and times. These data strengthen the relevance of the correct cleaning procedure, considering that biofilms formations might be an important source of food contamination.

Keywords. STEC non-O157, biofilms, Shiga toxin-producer, stainless steel.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli produtoras de toxina Shiga (STEC) causam, em humanos, diarreia que pode evoluir para colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica-urêmica (SHU). Surtos epidêmicos ou casos esporádicos graves são causados principalmente pelos sorotipos O157:H7, O157:H-, O26:H11, O111:H8, O111:H-, O103:H2, O113:H21 e O145:H⁻¹⁻⁴.

Animais domésticos e selvagens, principalmente ruminantes, como bovinos, ovinos e caprinos, são considerados os principais reservatórios de STEC⁵. A maioria dos estudos sobre a ocorrência de STEC em alimentos relaciona-se com surtos relacionados a carnes, entretanto leite não pasteurizado, água e produtos frescos tem sido relacionados⁶.

Tem-se observado que vários sorotipos de STEC têm a capacidade de aderir, colonizar e formar biofilme em grandes variedades de superfícies de contato, de materiais usados nas plantas de processamento de alimentos⁷. Biofilmes formados por micro-organismos patogênicos têm sido considerados de grande importância no contexto de segurança alimentar despertando o interesse de inúmeros grupos de pesquisas⁸⁻¹¹. Segundo Farrock et al¹², poucos trabalhos têm sido realizados no desenvolvimento de biofilmes de STEC dentro do contexto de produtos lácteos, embora saiba-se que, como outras bactérias, a STEC O157:H7 é capaz de aderir e formar biofilmes em superfícies que são comumente utilizadas em ambientes de processamento de alimentos como aço inoxidável. Portanto, os dados apresentados neste trabalho são importantes para confirmar a capacidade de cepas de STEC não-O157 formarem biofilmes em superfícies que são comumente utilizadas na indústria de alimentos, que podem servir como fonte de contaminação cruzada, acarretando casos e surtos de doenças veiculadas por alimentos. Nesse âmbito, realizou-se também a avaliação da eficiência de sanitizantes de uso industrial na remoção de biofilmes formados, visando a inocuidade alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

As cepas utilizadas no presente trabalho foram STEC O153:H25, O113:H21 e O111:H8, isoladas de bovino no estado do Rio de Janeiro¹³. A identificação destes micro-organismos foi confirmada por observação microscópica dos aspectos morfológicos e tintoriais em lâminas com esfregaço corado pelo método de Gram, testes bioquímicos¹⁴ e pesquisa por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dos genes produtores de toxina Shiga *stx1* e *stx2*¹³.

A capacidade de formação de biofilme foi testada em cupons de aço inoxidável AISI 304 com acabamento número 4 (#4). O material com estas especificações é o mais utilizado pela indústria de alimentos na construção de equipamentos, bancadas e utensílios em geral. Foram utilizados cupons com dimensões de 1,0 cm x 1,0 cm¹⁵. Cada cupom de aço inoxidável estéril foi imerso em tubo contendo 10 mL de *Trypticase Soy Broth* (TSB) com suspensão de células das STEC de 10³ UFC/mL. Essa população foi verificada, em todos os experimentos, por semeadura em placas. Os cupons foram incubados a temperatura de 25 °C e avaliadas quanto à formação de biofilme nos tempos 6, 12, 24 e 48 h. Como controle utilizou-se cupons imersos no meio de cultivo estéril não inoculado.

Os cupons de aço inoxidável foram retirados do meio de cultivo TSB com o auxílio de uma pinça estéril e foram imersos em 10 mL de *Phosphate Buffer Salt* (PBS), por 1 min, para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de PBS e agitados em vortex, durante 2 min para remoção de células sésseis¹⁶. Diluições seriadas adequadas foram transferidas pelo método de plaqueamento em superfície para placas de Petri contendo TSA (Difco®) e incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h, determinando-se desta forma, o número de UFC/cm² aderidas a cada cupom¹⁵.

Na avaliação da eficácia do sanitizante hipoclorito de sódio, soluções nas concentrações de 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹ foram preparadas em água destilada esterilizada, com no máximo 15 min de antecedência ao uso. Os cupons foram

retirados dos meios de cultivo TSB inoculado com STECs após 6, 12 e 24 h, com o auxílio de uma pinça esterilizada, imersos em 10 mL de PBS por 1 min e enxaguados com água peptonada 0,1 % para a remoção de células planctônicas. Em seguida, foram imersos em tubos contendo 10 mL das soluções sanitizantes. Após o tempo de contato de 15 min, os cupons foram transferidos para tubos contendo 5 mL de PBS adicionado de tiosulfato de sódio a 1 %, para a inativação da ação do sanitizante. Os cupons foram agitados em vórtex por 2 min para remoção das células sésseis. Foram preparadas as diluições apropriadas, semeadas em *Trypticase Soy Agar* (TSA) e incubadas a 35 ± 1 °C por 48 ± 1 h.

Foi realizada simultaneamente a enumeração da população dos cupons controles, ou seja, aqueles que não receberam o sanitizante. Esta contagem foi utilizada para avaliar o efeito dos sanitizantes sobre os biofilmes formados. Foram realizados três experimentos independentes, tanto para a formação de biofilmes microbianos quanto na eficácia dos sanitizantes, em duplicata, tendo sido o tratamento estatístico dos resultados obtido pela análise de variância (ANOVA) em delineamento inteiramente casualizado, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Para comparação entre as médias foi utilizado

o teste de comparação múltipla de Tukey. Para tal, foi utilizado o programa *Graph Pad Prism*®, versão 5.01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução do número de células sésseis aderidas à superfície de aço inoxidável após remoção das células planctônicas, caracterizando a formação de biofilmes dos isolados de STEC O153:H25, O113:H21 e O111:H8 é apresentada na Figura 1.

As maiores contagens de células sésseis de STEC O153:H25, O113:H21 e O111:H8 nos cupons de aço inoxidável AISI 304 #4, foram encontradas após 48 horas, com valores médios de 6,04 log UFC/cm², 5,86 log UFC/cm² e 5,90 log UFC/cm², respectivamente, caracterizando a formação de biofilmes microbianos, pois as contagens referem-se à células sésseis que ficaram aderidas à superfície, mesmo após a retirada das células planctônicas.

Houve diferença significativa entre todos os tempos de formação de biofilmes das STEC estudadas (6, 24 e 48 h). Na análise entre as cepas amostradas, constatou-se diferença significativa entre os mesmos tempos das diferentes cepas, com exceção do tempo de 24 h, quando comparou-se STEC O153:H25 e STEC O111:H8 e no tempo de 48 h, quando comparou-se STEC O113:H21 e STEC O111:H8.

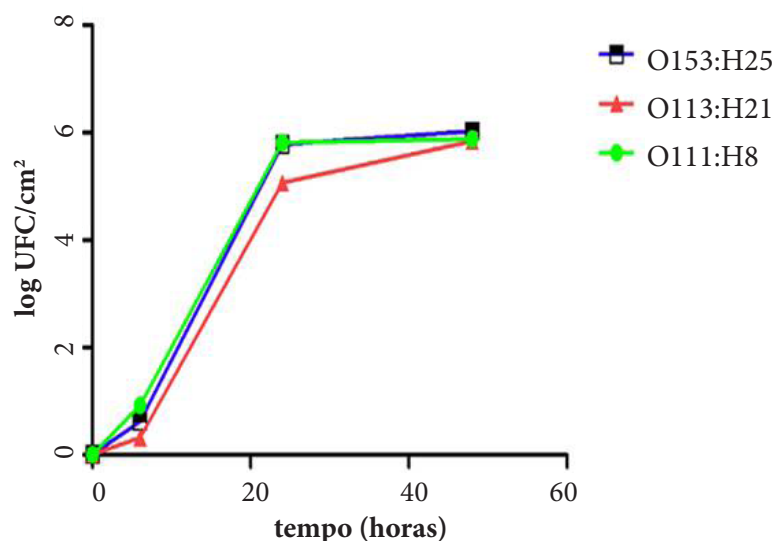


Figura 1. Evolução da população (log UFC/cm²) de células sésseis de isolados de *E. coli* STEC não-0157 sobre cupons de aço inoxidável AISI 304#4. Cada ponto corresponde à média de três repetições em triplicata

Analisando os diferentes tempos, na maior parte foi encontrada diferença significativa, com exceção da STEC O113:H21 (contagem de 48 h) comparada à STEC O111:H8 no tempo de 24 h.

Os dados resultantes deste trabalho contribuem com informações na literatura científica sobre a formação de biofilmes microbianos de cepas de STEC não-O157. Estudos sobre a formação de biofilmes em STEC são principalmente relatados ao sorotipo O157:H7 e há poucos dados relacionados à formação de biofilmes em outros sorotipos^{12,17,18}. Este fato é preocupante, pois há diferenças na capacidade de adesão entre os diferentes sorotipos como observado no presente trabalho. O conhecimento sobre o comportamento destes microrganismos em aderir e formar biofilmes nas diferentes superfícies do processamento de alimentos é imprescindível para a inocuidade de alimentos e adequação dos processos de higienização para prevenir contaminações cruzadas.

Rivas et al¹⁹ avaliaram a capacidade de formação de biofilmes por dez diferentes cepas de *E.coli*, sendo sete de STEC (O157:H7, O157:H-, O91:H21 e O174:H21) e três de não-STECS (não toxigênico O157:HR, O13rel:H4 e O1:H7), por duas metodologias, a avaliação por microplacas de poliestireno e superfícies de aço inoxidável e demonstraram que cada cepa tem habilidade diferente de formação de biofilme em cada superfície e que todas as cepas possuíam a capacidade de se aderir em superfície de aço inoxidável, fato este que não ocorreu na metodologia de microplacas. Os autores sugeriram que a produção de biofilmes em microplaca de poliestireno pode não ser apropriada para representar outras superfícies e que se deve ter atenção ao escolher o método de quantificação de biofilme em superfícies. Os mesmos autores reforçaram a necessidade da pesquisa da capacidade de formação de biofilmes por cepas de interesse, por terem comportamentos diferentes.

A formação de biofilmes por *E.coli* STEC é associada à expressão de diferentes adesinas como, por exemplo, fimbria tipo1, curli, Ag43, Cah e EhaA¹⁷. Biscola et al¹⁷, ao estudarem a formação de biofilmes, verificaram a

presença de genes relacionados a diferentes adesinas, em 18 cepas de O157 e 33 cepas não-O157, observaram a formação em 5/18 (28 %) cepas de O157 STEC e 17/33 (51 %) de não O157 a temperatura de 28 °C por 48 h. A pesquisa de genes associados com adesão é importante, porém estes podem não ser expressos, dependendo das condições ambientais. Por este motivo, a avaliação da formação de biofilmes em aço é essencial para demonstrar a característica fenotípica.

Segundo Meyer²⁰, existem três estratégias para se tentar solucionar os problemas dos biofilmes: i) sanitização antes da sua formação, ii) sanitização após sua formação, ou iii) utilização de materiais que não favoreçam a formação dos mesmos. Neste sentido, foi testado o sanitizante mais comumente utilizado nas superfícies do processamento de alimentos, o hipoclorito de sódio em duas concentrações usualmente utilizadas, 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹²¹, por ser eficiente e de baixo custo. No presente estudo, as contagens iniciais de células sésseis das cepas das STEC O153:H25, O113:H21 e O111:H8 foram reduzidas aos níveis inferiores a 1 log UFC/cm² após sanitização com hipoclorito de sódio 100mg.L⁻¹ e 200mg.L⁻¹ conforme observa-se nas Figuras 2 a 4. Estes dados são importantes, pois se observa que se utilizados de forma correta, o agente sanitizante para estas cepas, são eficazes, considerando-se a importância da correta elaboração e implantação do programa de higienização de processamento da matéria-prima e na planta de processamento de alimentos. Ressalta-se a importância da observação dos critérios de utilização deste produto, pois o hipoclorito de sódio possui baixa estabilidade e sofre influência da luz, temperatura e pH, afetando sua eficiência.

Há poucos trabalhos sobre a suscetibilidade de cepas de *E.coli* STEC não-O157 produtoras de toxina Shiga a sanitizantes¹⁸, o que reforça a necessidade de maior pesquisa nesta área, considerando que surtos epidêmicos ou casos esporádicos graves são causados principalmente pelos sorotipos O157: H7, O157: H-, O26: H11, O111: H8, O111: H-, O103: H2, O113: H21 e O145: H-¹⁻⁴.

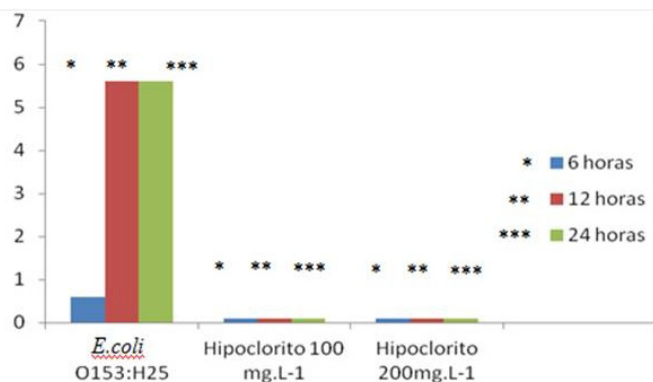


Figura 2. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* STEC O153:H25, formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4

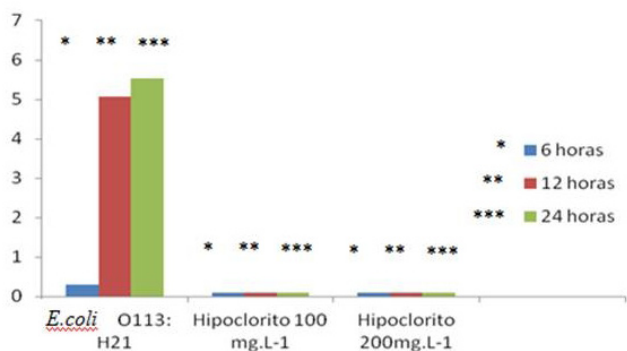


Figura 3. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* STEC O113:H21, formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4

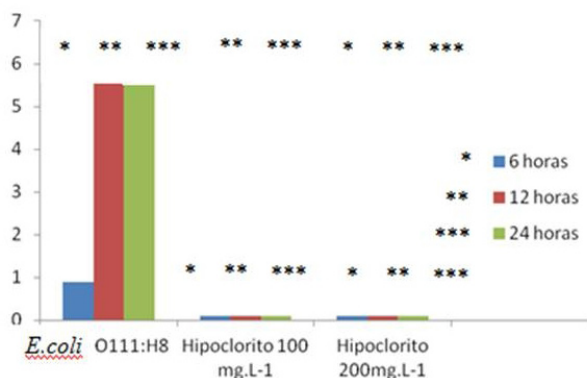


Figura 4. Efeito da aplicação de sanitizantes sobre biofilmes de *E. coli* STEC O111:H8 formados sobre cupons de aço inoxidável AISI 304 #4

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que cepas de STEC não-O157, sorotipos O153:H25, O113:H21 e O111:H8 isolados no país, apresentam a capacidade de formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável, o que serve de alerta para a importância dos programas de sanitização preventivos. O hipoclorito de sódio nas concentrações utilizadas neste estudo foi eficiente para reduzir a contagem de células sésseis dos biofilmes, ressaltando a importância do correto programa de higienização na inocuidade dos alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Caprioli A, Tozzi AE, Rizzoni G, Karch H. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg Infect Dis*.1997;3:578-9. [DOI: 10.3201/eid0304.970425].
2. Ethelberg S, Smith B, Torpdahl M, Lisby M, Boel J, Jensen T et al. Outbreak of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection from consumption of beef sausage. *Clinic Infect Dis*. 2009;48:78-81. [DOI: 10.1086/597502].
3. Johnson RP, Clarke RC, Wilson JB, Read SC, Rahn K, Renwick SA et al. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Food Prot*. 1996;59(10):1112-22.
4. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eae, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb0111, and rfb0157. *J Clin Microbiol*. 1998;36:598-602.
5. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheurtz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of health domestical animals. *J Clin Microbiol*.1993;31:2483-8.
6. Vogeeler P, Tremblay YDN, Mafu AA, Jacques M, Harel J. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol*.2014;5(317):1-12. [DOI:10.3389/fmicb.2014.00317].

7. Wang R, Bono JL, Kalchayanand N, Shackelford S, Harhay DM. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strain and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. *J Food Prot.*2012;75(8):1418-28. [DOI:10.4315/0362-028x.jfp-11-427].
8. Zottola EA, Sasahara KC. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *Int J Food Microbiol.*1994;23:125-48. [DOI: 10.1016/0168-1605(94)90047-7].
9. Gândara ALN, Oliveira JS. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. *Ciênc Tecnol Aliment.*2000;20(1):1-7. [DOI: 10.1590/S0101-20612000000100001].
10. Sharma M, Anand SK. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control.*2002;13(6-7):469-77. [DOI: 10.1016/S0956-7135(01)00068-8].
11. Shi X, Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Tech.* 2009;20(9):407-13. [DOI: 10.1016/j.tifs.2009.01.054].
12. Farrockh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppgaard H, Raynaud S et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int J Food Microbiol.*2013;162:190-212. [DOI:10.1016/j.ifofoodmicro.2012.08.008].
13. Gonzalez AGM. Características fenotípicas e genotípicas de cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas de bovinos no Estado do Rio de Janeiro [tese de doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.
14. Zadik PM, Chapman PA, Siddons CA. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol.*1993;39(2):155-8.
15. Esper RML. Enterobacter sakazakii (*Cronobacter* spp.) e *Bacillus cereus*: *Quorum sensing*, formação de biofilme e ação de sanitizante [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2010.
16. Parizzi SQF, Andrade NJ, Silva CAS, Soares NFFS, Silva EAM. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz Arch Biol Technol.*2004;47(1):77-83. [DOI: 10.1590/S1516-89132004000100011].
17. Biscola FT, Abe CM, Guth BEC. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Appl Environ Microbiol.*2011;77(7):2201-08. [DOI:10.1128/AEM.01920-10].
18. Fouladkhah A, Geornaras I, Sofos JN. Biofilm formation of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella Typhimurium* and Newport and their inactivation by sanitizers. *J Food Sci.*2013;78:880-6. [DOI: 10.1111/1750-3841.12123].
19. Rivas L, Dykes GA, Fegan N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and microtitre plate method. *J Microbiol Meth.*2007;69:44-51. [DOI: 10.1111/1750-3841.12123].
20. Meyer B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int Biodeter Biodegr.* 2003;51(4):249-53. [DOI: 10.1016/20964-8305(03)00047-7].
21. Santos MV. Boas Práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite. *In: O Brasil e a nova era do mercado do leite – Compreender para competir.* 1ª ed. Piracicaba: Agripoint Ltda; 2007.p.135-54.

Implantação e avaliação das Boas Práticas de Fabricação – BPF: estudo de caso

Establishing and evaluating the Good Manufacturing Practices - GMP: a case study

RIALA6/1647

Marcia Regina SINHORINI, Lindomar Subtil de OLIVEIRA, Alexandre da Trindade ALFARO*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Linha Santa Bárbara, s/nº, Francisco Beltrão, PR, Brasil, CEP: 85601-971. E-mail: alexandre@utfpr.edu.br

Recebido: 05.09.2014 - Aceito para publicação: 24.06.2015

RESUMO

O programa de Boas Práticas de Fabricação (BPF) é uma importante ferramenta, largamente utilizada para garantir o padrão de qualidade exigido pelo mercado consumidor. Este trabalho aborda os procedimentos empregados para realizar a implantação e monitoramento do BPF para uma planta de produção de farinhas e óleos de aves. Para a execução do trabalho, apresentou-se o programa à direção da empresa e formou-se uma equipe multidisciplinar. Na sequência, caracterizou-se o processo *in loco* para obter informações a respeito da elaboração do manual. Uma das etapas fundamentais do processo foi a aplicação de treinamentos ministrados pela gestora da qualidade. A última etapa do trabalho constituiu-se no monitoramento do programa por meio de auditorias internas. Observou-se que as auditorias influenciaram significativamente na melhoria de todas as etapas de implantação. A implantação das BPF resultou na aplicação de medidas corretivas com o envolvimento de toda equipe organizacional.

Palavras-chave. gestão da qualidade, melhoria de processos, controles, auditorias, boas práticas de fabricação.

ABSTRACT

The Good Manufacturing Practices (GMP) Program is an important tool widely used to ensure the standard of quality required by the market. This paper discusses the procedures for implementing and monitoring the GMP for a plant of production of flour and oils obtained from birds. For performing this work, the program was presented to the company management and a multidisciplinary team was constituted. In sequence, the *in loco* process was characterized in order to get information regarding to the manual preparation. One of the key steps of the process was the implementation of training given by the quality manager, aiming at substantiating them on the awareness of employees requirements to convey the necessary knowledge to meet the GMP program. The last stage of the work was consisted of monitoring the program through the internal audits. It was observed that the audits significantly influenced for improving the all of the phases of implementation. The GMP implementation resulted in the improvement of corrective measures with the involvement of all organizational staff.

Keywords. quality management, process improvement, controls, audits, good manufacturing practices.

INTRODUÇÃO

É crescente a exigência pela implantação do sistema de Boas Práticas de Fabricação (BPF) nos estabelecimentos que fabricam farinhas e óleo de origem animal. O programa obedece aos critérios estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)¹ por meio da Instrução Normativa nº 34, de 28 de maio de 2008.

As BPF para a cadeia de subprodutos constituem uma das maneiras de garantir o padrão de qualidade exigido tanto pelo mercado interno, como pelo mercado externo, pois somente com a junção de vários procedimentos implementados e definidos por programas de qualidade, obtém-se competitividade global dos produtos². Trata-se de procedimentos higiênico-sanitários e operacionais que devem ser executados em todo fluxo de produção, desde a obtenção dos resíduos animais até a distribuição do produto final, com vistas a garantir farinhas e produtos gordurosos de origem animal, aptos para produção de alimentos para os animais¹.

Os procedimentos de higienização são fundamentais para assegurar a qualidade do produto final³. A inocuidade do produto final é resultante da ausência de perigos físicos, químicos e biológicos que podem ocasionar danos à saúde⁴.

O consumo de carne de frango vem aumentando nos últimos anos devido a sua maior incorporação na dieta e também pela substituição de outras carnes, o que proporciona um aumento do rendimento dos frigoríficos⁵. A indústria de processamento de subprodutos frigoríficos ou fábrica de farinha e óleo de origem animal é o setor terminal de um processo industrial, responsável pelo processamento de subprodutos rejeitados no abatedouro como penas, vísceras, cabeças, pés, sangue, entre outros⁶.

Para garantir adequado padrão de qualidade em toda a cadeia de produção faz-se necessário o controle e registros que permitam a rastreabilidade de toda a produção⁷, conferindo segurança ao produto e permitindo que, caso ocorra algum problema, o mesmo seja facilmente localizado e recolhido⁸. A principal dificuldade encontrada na implantação do sistema BPF

consiste na falta de conhecimento do programa pelos colaboradores⁹.

Este trabalho teve como objetivo detalhar o processo de implantação e avaliação do sistema de gestão da qualidade (Boas Práticas de Fabricação) em uma indústria de processamento de subprodutos frigoríficos (penas e vísceras).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo possuiu cunho descritivo do tipo estudo de caso, uma vez que se caracteriza por descrever e analisar um sistema através de um contexto local e real, sendo que, por meio de um planejamento prévio, foi efetivado a partir de reuniões com a equipe de qualidade e direção que disponibilizaram condições para que fosse iniciada a implantação do programa de BPF. O trabalho foi realizado no período de maio a novembro de 2013.

Apoiando-se em gráficos demonstrativos, foram feitas análises quantitativas com os resultados referentes às auditorias realizadas de acordo com orientações específicas para alimentação animal. Igualmente, foram aplicadas análises baseadas em um questionário (não apresentado) composto de 16 perguntas, com questões abertas e estruturadas e semiestruturadas³. As perguntas tratavam de conceitos básicos relacionados às BPF e sua aplicação a campo.

O estudo foi desenvolvido na região Sudoeste do Paraná, em uma fábrica de subprodutos de origem animal que atua sob legislação dos Serviços de Inspeção Federal (S.I.F). A organização atua no processamento de subprodutos provenientes de frigoríficos, resultando em insumos para a ração animal. Os produtos comercializados são: farinha de vísceras de aves, farinha de penas e óleo de vísceras de aves. A planta industrial conta atualmente com 190 colaboradores, com capacidade de processo de 1000 ton. de material *in natura*/dia, resultando em 1500 ton./mês de farinha de vísceras, 1500 ton./mês de farinha de penas e 675 ton./mês de óleo de vísceras de aves, totalizando 3.675 ton./mês de produto acabado.

Na primeira etapa do estudo, ocorreu a formalização e apresentação do programa de BPF para a direção da unidade e, na sequência para todos os colaboradores. Também nessa etapa, aplicou-se um questionário para verificar qual o nível de entendimento sobre o programa.

Verificou-se, durante 15 dias, o processo produtivo *in loco* desde o recebimento da matéria-prima até a expedição do produto acabado. Os equipamentos envolvidos no processo foram avaliados e a partir disso elaborou-se um PPHO (Procedimento Padrão de Higiene Operacional) para ser aplicado.

Manual de Boas Práticas de Fabricação

O manual de Boas Práticas de Fabricação foi elaborado com a descrição de todas as atividades realizadas na indústria, sendo exclusivo e intransferível. Modificações deviam ser efetuadas quando houvesse alterações na estrutura física ou operacional da organização. O manual contém todos os POP (Procedimentos Operacionais Padrão) da indústria.

Treinamentos e verificações

Nesta etapa, a equipe de qualidade ministrou treinamentos aos colaboradores de distintos setores, como: higiene pessoal, potabilidade da água, utensílios, entre outros. Todas as informações foram registradas em livros atas, registrando-se os nomes dos participantes, data e a carga horária.

Avaliação das BPF – Auditorias

A ferramenta utilizada como embasamento para avaliação das melhorias na fábrica foi a Instrução Normativa nº 34 do MAPA¹, de 28 de maio de 2008, que regulamenta o funcionamento de indústrias processadoras de resíduos frigoríficos.

Na fase que antecedeu a implantação das BPF, foram realizadas três auditorias internas na fábrica, com intervalos de dois meses entre elas. Foram avaliados 92 itens, julgando-os como conforme (C) ou não conforme (NC). A abrangência dos itens foi: instalações, equipamentos e utensílios; higiene do estabelecimento e pessoal; processo produtivo e tecnológico; embalagens e rotulagens; comercialização e transporte e garantia da qualidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de uma visão sistêmica do processo produtivo, envolvendo desde o planejamento, a execução de melhorias e a checagem das mesmas e, por conseguinte a avaliação final (ciclo PDCA), foi possível implantar a prática da melhoria contínua, da mudança cultural e conseqüentemente a redução de custos por meio da diminuição das perdas, retrabalho e desperdício.

A implantação do programa de BPF exigiu mudanças comportamentais e de disciplina, residindo então sua maior dificuldade de aplicação. A Figura 1 apresenta os resultados obtidos, referente ao conhecimento dos colaboradores sobre as Boas Práticas de Fabricação. Observa-se que 91 % dos colaboradores afirmaram que possuíam algum conhecimento sobre o assunto.

Outro item abordado referiu-se à participação em treinamentos, acusando que apenas 58,9 % já tiveram essa vivência, enquanto que 41,1 % não vivenciaram essa participação. Já com relação ao questionamento sobre a higienização das mãos após o uso de sanitários, a unanimidade (100 %) respondeu que sim, ou seja, que faziam uso dessa prática. Por outro lado, verificou-se que 89 % dos colaboradores sabiam da importância e faziam uso das barreiras sanitárias, apenas 1 % não demonstrou conhecimento sobre a proibição em comer e utilizar adornos nas dependências da fábrica e 6 % dos participantes demonstraram não saber sobre a permanência na área limpa e na área suja.

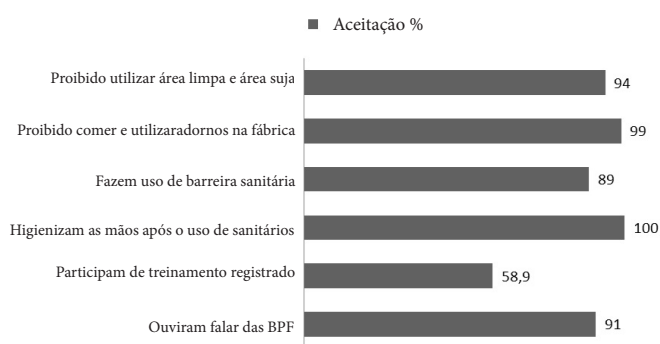


Figura 1. Pesquisa sobre o conhecimento dos colaboradores sobre Boas Práticas de Fabricação

Para o item instalações, equipamentos e utensílios, dos 24 itens analisados, 88 % estavam conformes e 12 % não conformes. Com relação a higiene da planta e pessoal, dos 14 itens avaliados, 35 % encontravam-se fora dos padrões. Sobre os processos produtivos e tecnológicos, de 19 itens julgados apenas 10 % deles não atenderam as especificações. Em relação às embalagens e rotulagens, foram analisados 6 itens e 100 % deles estavam conformes. O mesmo ocorreu para a comercialização e transporte, haja vista que os 2 itens avaliados estavam dentro dos padrões de conformidade. Por fim, no quesito garantia da qualidade apenas um item não atendeu a normativa.

Observou-se que, apesar do elevado percentual de conhecimento sobre as BPF por parte dos colaboradores, verificado no questionário, não se obteve essas evidências no segundo módulo de auditoria inicial. A equipe de qualidade apontou para a direção da empresa as principais deficiências e não conformidades observadas, com o objetivo de posicionar as condições atuais da fábrica, indicando um ponto de partida para a implantação das BPF.

Após o início dos trabalhos de adequação das instalações, do desenvolvimento de procedimentos padrões para a realização das atividades, de planilhas de registros, monitoramentos, controle e adequações das não conformidades obtiveram-se, por meio das auditorias formais de qualidade, um percentual crescente de itens em conformidades, conforme apresentado na Figura 2.

De posse dos dados obtidos, observam-se na Figura 2, os resultados das quatro auditorias realizadas. Ressalta-se que a primeira auditoria ocorreu antes da implantação das BPF, para que fosse utilizada como parâmetro para as demais.

Com relação ao primeiro item instalações de equipamentos e utensílios, observou-se que 12,5 % apresentaram NC na primeira auditoria, sendo que no decorrer das outras três auditorias o índice de NC decresceu, obtendo um ótimo nível de aceitação na última auditoria (98,8 %).

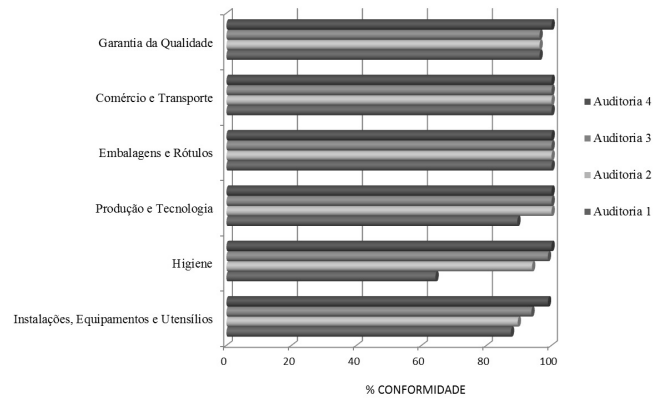


Figura 2. Resultados das auditorias internas de qualidade realizadas numa planta de produção de farinhas e óleos de aves

No parâmetro higiene, ficou evidente a falta de cumprimento na primeira vistoria (64,2 %), sendo que na segunda auditoria houve uma crescente melhoria, elevando o índice para 94 % de atendimento e atingindo uma conformidade de 99,9 % na última vistoria. Esses resultados vêm de encontro com o programa de treinamento que foi eficientemente aplicado aos colaboradores, durante a execução desse trabalho.

Nos itens embalagens, rotulagens, comercialização e transporte obtiveram-se em todas as auditorias 100 % de conformidades, não apontando inconformidade nesses setores.

No último item avaliado, garantia da qualidade, o único parâmetro que estava em desacordo com a normativa já mencionada, considerando os 27 itens avaliados, foi à falta do manual de BPF, item 100 % satisfeito somente na última auditoria, onde havia sido implantado o manual de BPF.

CONCLUSÃO

Com as auditorias internas realizadas pode-se afirmar que após a implantação das BPF os objetivos estabelecidos foram atingidos. As principais dificuldades encontradas durante a implantação do programa foram: a capacitação dos colaboradores e a necessidade de mudanças na cultura da organização. Com a implantação das BPF observou-se uma elevação no índice de conformidades.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 34, de 28 de maio de 2008. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Higiénico-Sanitária e Tecnológica do Processamento de Resíduos de Animais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 29 mai. 2008. Seção 1.
2. União Brasileira de Avicultura - UBA. Norma Técnica de Produção Integrada de Frango. [acesso 2012 Nov 16]. Disponível em: [<http://www.uba.org.br>].
3. Figueiredo VF, Costa Neto, PL. Implantação do HACCP na indústria de alimentos. *Gest Prod*. 2001;8(1):100-11.
4. Germano PM, Germano, MIS. Qualidade das matérias-primas. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 3ª ed. Barueri: Manole; 2008.
5. Roque VF. Avaliação do aproveitamento de resíduos em indústrias de carne de frango. XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos; 2002; Porto Alegre, Brasil,
6. Bellaver, C. Ingredientes de origem animal destinados à fabricação de rações. II Simpósio Brasileiro Alltech da Indústria de Alimentação Animal; 2005; Curitiba, Brasil.
7. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Associação Nacional dos Fabricantes de Rações. São Paulo: Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal; 2009.
8. Butolo JE. Qualidade de Ingredientes na Alimentação Animal. Campinas: 1ª ed. Colégio Brasileiro de Alimentação Animal; 2002.
9. Calarge FA, Satolo EG, Satolo LF. Aplicação do sistema de gestão da qualidade BPF (boas práticas de fabricação) na indústria de produtos farmacêuticos veterinários. *Gest Prod*. 2007;14(2):379-92. [DOI: 10.1590/S0104-530X2007000200014].
10. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 06 nov. 2002. Seção 1.

Melhoria do gerenciamento de resíduos de saúde para laboratórios: a experiência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ

Proposal for improving the health-care waste management for laboratories

RIALA6/1648

Anna Christina Rosa GUIMARÃES^{1*}, Karen FRIEDRICH², Isabella Fernandes DELGADO³

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Avenida Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel: 21 3865-5151. E-mail: anna.guimaraes@incqs.fiocruz.br

²Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

³Vice-Diretoria de Pesquisa, Ensino e Projetos Estratégicos, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

Recebido: 12.12.2014 - Aceito para publicação: 25.06.2015

RESUMO

Os Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) representam um desafio para os prestadores de serviços de saúde humana e animal, em função do risco que representam, e necessitam de tratamento diferenciado se comparado aos resíduos sólidos urbanos. Com uma larga gama de produtos e serviços, os laboratórios analíticos são locais que geram RSS de amplo espectro quanto à natureza e grau de risco. O objetivo principal deste documento é apresentar uma sistemática para introduzir o monitoramento do gerenciamento de RSS para laboratórios de saúde pública, tendo como modelo o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz). Foram definidas etapas para concepção de um modelo de avaliação e monitoramento, para reduzir a geração dos RSS, para minimizar os impactos ambientais e auxiliar os administradores na gestão dos recursos financeiros. A sistemática proposta contribui para uma análise crítica do gerenciamento dos RSS e fornece dados consistentes para auxiliar na tomada de decisões. Constatou-se que as dificuldades de execução do plano de gerenciamento dos RSS, que geram situações de grave risco sanitário e ambiental, podem ser dirimidas com correto monitoramento de suas etapas.

Palavras-chave. gerenciamento de resíduos, resíduos de serviços de saúde, indicadores de gestão.

ABSTRACT

The health-care wastes (HCW) represents a challenge for the animal and human health service providers, in function of the risk and the needing for a differentiated handling when compared to the urban solid residues. In function of the broad range of products and services, the analytic laboratories generate a spectrum concerning the risk nature and rank. The main objective of this document is to provide basic coming for monitoring through the performance indicators. Steps here defined for designing a monitored model to reduce the generation of waste, to minimize environmental impacts, to reduce accidents and to assist the administrators in managing the financial resources. This research could contribute to a critical analysis of the HCW, providing consistent data, which are important for decision making at tactical and operational levels.

Keywords. waste management, health care waste, management indicators.

INTRODUÇÃO

A partir da segunda metade do século XX, com os novos padrões de consumo da sociedade capitalista, a produção de resíduos vem crescendo continuamente em ritmo superior à capacidade de tratamento e disposição ambientalmente adequada desses dejetos. Segundo dados do IBGE a população brasileira cresceu 17 %, nos últimos dez anos, enquanto a geração de resíduos cresceu 48 %¹.

Nesse caminho, uma das grandes preocupações da Saúde Pública atualmente é a crescente geração de resíduos sólidos urbanos, consequência do aumento populacional, da rápida industrialização e do crescimento do consumo, somado ao modelo de desenvolvimento e do estilo de vida contemporâneos².

Com isso, colaborar na diminuição dos riscos ambientais à saúde constitui-se também uma das missões fundamentais do Sistema Único de Saúde (SUS), coerente com o princípio constitucional de que todos os cidadãos têm direito a acesso igualitário às ações que visem à proteção à saúde³.

Reconhecendo sua importância, bem como suas dificuldades e complexidades inerentes a sua plena execução, o gerenciamento desses resíduos deve ser avaliado e monitorado de acordo com o desenvolvimento de instrumentos de avaliação e controle, incluindo a construção de indicadores claros, objetivos, auto explicativos e confiáveis que permitam acompanhar a eficácia do processo⁴.

Este relato apresenta a experiência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é uma unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – uma instituição pública composta por laboratórios analíticos. As atividades técnico-laboratoriais do INCQS abrangem ensaios diversificados que demandam a manipulação de amostras e manejo de seus resíduos que apresentam potencial de promoção de riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

A apresentação da proposta de monitoramento do gerenciamento interno dos RSS do INCQS, realizada neste trabalho,

busca contribuir para a melhoria deste processo em laboratórios da área de saúde pública. Como relevância do trabalho, evidenciam-se contribuições para: reduzir e ordenar a geração de resíduos; proteger a saúde da equipe, da comunidade e do meio ambiente; agir preventivamente visando à promoção da biossegurança no Instituto; melhorar as medidas de segurança e promover a conscientização da equipe sobre a necessidade de identificação e destinação correta dos resíduos oriundos de suas atividades de trabalho.

Para a definição da sistemática de indicadores de desempenho foram utilizados os critérios do Guia do Ministério do Planejamento Orçamento e Gestão (MPOG) - o “Guia Referencial para Medição de Desempenho”⁵. Este Guia do MPOG sugere um conjunto de etapas que assegurem a coerência da formulação e implementação do conjunto de indicadores de desempenho. A seleção de indicadores deu-se a partir de exemplos de indicadores compulsórios, exigidos na RDC da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) nº 306/2004⁶, manuais e relatórios técnicos^{3,4,7}.

Uma vez selecionados os indicadores, foi necessário definir com qual dimensão cada indicador se relacionava. A seleção foi desenvolvida de forma que contemplasse tanto as dimensões de esforço, quanto as de resultado, para possibilitar uma mensuração do processo de monitoramento do gerenciamento de forma integrada.

Na etapa seguinte, procedeu-se uma avaliação dos critérios teóricos e conceituais (seletividade, simplicidade e clareza) e das fontes de informação (acessibilidade, rastreabilidade). Esses critérios serviram de base para decisão de manter, modificar ou excluir os indicadores inicialmente propostos. Em seguida, estabeleceram-se as fórmulas matemáticas, definiram-se os responsáveis pela apuração do indicador, e a periodicidade de coleta dos dados para cálculo de cada indicador.

Para a comunicação dos resultados obtidos, foi gerado um painel de indicadores de desempenho com seus respectivos valores em formato de gráficos e linhas de tendência.

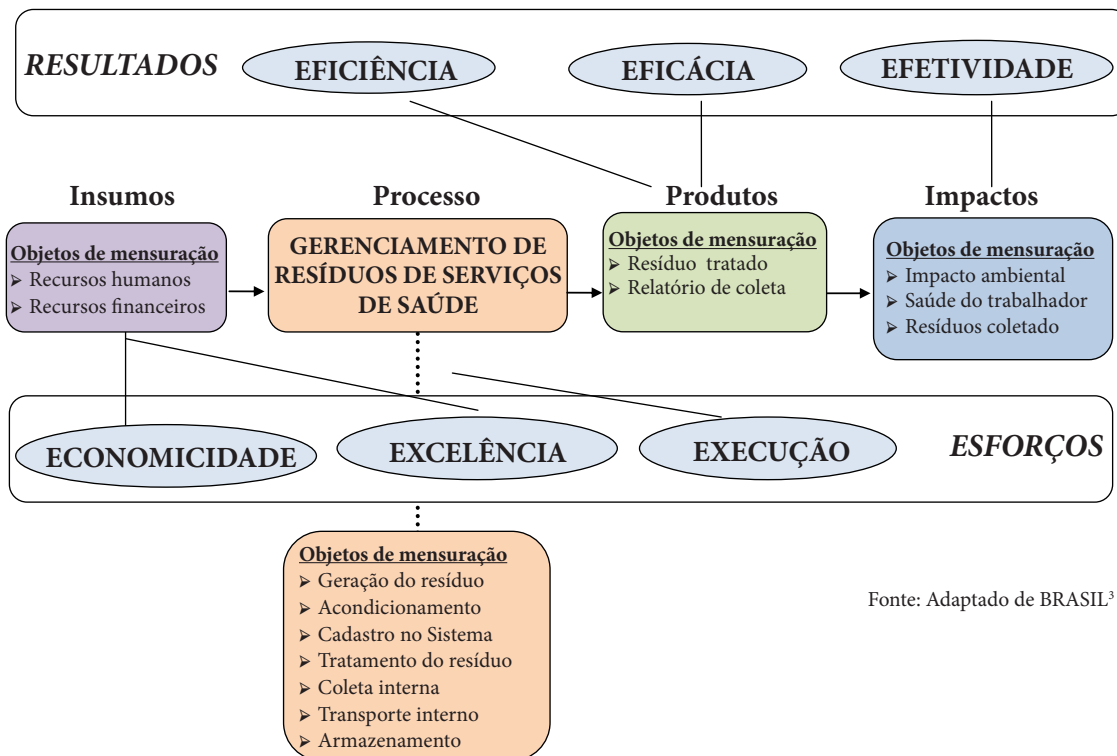


Figura 1. Diagrama da Cadeira de Valor para o gerenciamento de RSS

A Figura 1 representa a análise realizada para o processo de gerenciamento de RSS do INCQS com identificação dos objetos de mensuração por dimensão para orientar a modelagem dos indicadores.

A seleção dos indicadores gerou uma listagem de 24 (vinte e quatro) indicadores pré-selecionados onde foram avaliados os objetos de medição, a dimensão que pretende-se avaliar e a referência bibliográfica (fonte de informação) do indicador. No processo de avaliação desses indicadores, optou-se por proceder à etapa de seleção e priorização com todos os 24 indicadores. Na mesma etapa ficou definida periodicidade trimestral para coleta de dados, apuração e cálculo dos indicadores.

A seleção e priorização dos indicadores permitiu estabelecer um ranqueamento dos indicadores, classificando-os segundo uma ordem de prioridade, gerando a cesta de indicadores selecionados. Essa etapa de priorização permitiu selecionar 13 (treze) indicadores de desempenho. O painel de

Indicadores de Desempenho (ID) selecionados para compor o sistema de monitoramento de gerenciamento dos RSS é representado no Quadro 1.

Além dos indicadores compulsórios definidos pela RDC nº 306/04 da Anvisa⁶, foram mantidos os índices de mensuração de recursos humanos (ID08) e da variação da proporção de custos (ID09) como recomendado no manual de gerenciamento de resíduos de saúde do Ministério da Saúde³.

Sabe-se que um sistema de monitoramento e avaliação deve contemplar simultaneamente as diversas demandas, sejam internas, relacionadas ao aprendizado organizacional e à melhoria do desempenho, ou externas, voltadas ao governo, aos órgãos de controle e à sociedade. O modelo lógico⁵ do sistema de monitoramento utilizado na Figura 1 foi escolhido de forma que contemplasse tanto as dimensões de esforço, quanto as de resultado, e ao mesmo tempo possibilitasse acompanhamento e mensuração de forma integrada.

Quadro 1. Cesta de Indicadores selecionados para o gerenciamento de resíduos do INCQS

Identificador	Indicador	Objeto de mensuração	Fórmula	Expresso em	Meta
ID01	Variação da geração total de RSS	Geração de RSS	$[(\text{Peso total de resíduo gerado no ano} / \text{volume total de resíduos gerados no ano anterior}) - 1,0] \times 100$	-	Minimizar
ID02	Variação da proporção de resíduos do Grupo A em relação total de resíduos gerados	Geração de resíduos do Grupo A	$\frac{\text{Peso médio dos resíduos do Grupo A}}{\text{Peso médio total de resíduos gerados}} \times 100$	%	Minimizar
ID03	Variação da proporção de resíduos do Grupo B em relação total de resíduos gerados	Geração de resíduos do Grupo B	$\frac{\text{Peso médio dos resíduos do Grupo B}}{\text{Peso médio total de resíduos gerados}} \times 100$	%	Minimizar
ID04	Variação da proporção de resíduos do Grupo D em relação total de resíduos gerados	Geração de resíduos do Grupo D	$\frac{\text{Peso médio dos resíduos do Grupo D}}{\text{Peso médio total de resíduos gerados}} \times 100$	%	Minimizar
ID05	Variação da proporção de resíduos do Grupo E em relação total de resíduos gerados	Geração de resíduos do Grupo E	$\frac{\text{Peso médio dos resíduos do Grupo E}}{\text{Peso médio total de resíduos gerados}} \times 100$	%	Minimizar
ID06	Variação do percentual de reciclagem em relação total de resíduos do Grupo D	Variação do percentual reciclagem	$\frac{\text{Peso médio de resíduos recicláveis}}{\text{Peso médio total de resíduos do Grupo D}} \times 100$	%	Aumento
ID07	Taxa de frequência de acidentes com perfuro cortante (Grupo E)	Taxa de acidentes com perfuro cortantes	$[(\text{n}^\circ \text{ de acidentes com perfuro cortantes} / \text{n}^\circ \text{ total de acidentes ocorridos no ano})] \times 100$	acidentes/ano	Minimizar
ID08	Percentual de pessoas capacitadas no gerenciamento de resíduos	Profissionais capacitados	Nº profissionais capacitados em relação a todos os funcionários	%	Aumento
ID09	% de execução orçamentária	Recursos financeiros	$[\Sigma \text{ de recursos executado (em R\$)} / \Sigma \text{ de recursos destinados à Biossegurança (em R\$)}] \times 100$	%	Máxima
ID10	Variação da proporção do custo com gerenciamento de RSS	Custos com RSS	Custo médio (R\$) por L ou K de resíduo descartado/acondicionado	R\$ (reais)	Redução
ID11	Tempo de armazenamento do resíduo	Tempo de Armazenamento	Período de tempo em que o resíduo permanece no abrigo	Período de tempo (dias)	Redução
ID12	Índice de resíduos coletados pela Dirac	Relatório de coleta externa	$[\Sigma \text{ da quantidade de resíduos coletados} / \Sigma \text{ quantidade resíduos armazenados no abrigo}] \times 100$	%	Máximo
ID13	Índice de resíduos tratados	Resíduo biológico tratado	$[\Sigma \text{ da quantidade de resíduos coletados} / \Sigma \text{ quantidade resíduos armazenados no abrigo}] \times 100$	%	Máxima

Legenda: ID – Indicador

A etapa de seleção dos indicadores de desempenho foi condicionada ao conhecimento das normas e da legislação brasileira vigente^{6,8}. Não foram considerados indicadores adequados com tipo de assistência prestada em serviços nos quais ocorre a internação de pacientes, bem como índices normalmente utilizados para hospitais e unidades de atenção básica, recomendados pela Organização Mundial da Saúde⁹.

Zamoner¹⁰ alerta para o fato de que, na prática, nem sempre o indicador de maior validade é o mais confiável; nem sempre o mais confiável é o mais inteligível; nem sempre o mais claro é o mais sensível; enfim, nem sempre o indicador que reúne todas estas qualidades é passível de ser obtido com a periodicidade requerida. Apesar disso, julgamos que dada a importância, apesar da baixa confiabilidade ou periodicidade, optamos por alguns indicadores dada à sua importância para o GRSS e fortalecimento dessa prática na instituição, como os indicadores “Taxa de frequência de acidentes com materiais perfuro-cortantes” (ID07) e “Percentual de pessoas capacitadas em gerenciamento de resíduos” (ID08).

Como vantagem adicional, a implementação no INCQS do painel de indicadores, produto desse trabalho, tem a característica de incentivar a organização garantindo o atendimento à legislação e normas técnicas específicas. A sistemática proposta está baseada no manual de GRSS da Anvisa³ e se propõe a fornecer com linguagem simples, orientações técnicas básicas para monitoramento do gerenciamento dos RSS.

Neste contexto, os resultados desses estudos podem ser úteis não somente para a avaliação das ações relacionadas aos resíduos, mas também como forma de divulgar as ações de descarte para todos os entes componentes do gerenciamento.

Sendo assim, a comunicação é um fator preponderante para a integração da organização e o desdobramento dos resultados, internamente e externamente. A interação entre as equipes e o alinhamento de conhecimentos cria sinergia e um senso comum de atuação. O processo

de comunicação move as ações, estimula a mudança, gera a consciência e o engajamento, mantendo a organização na busca do melhor desempenho.

Para que a comunicação se dê de forma mais eficaz, o guia referencial do MPOG⁵ para medição do desempenho recomenda para a elaboração do material de comunicação alguns atributos: Seletividade – com escolha de resultados significantes para tomada de decisão do período analisado; Coerência – alinhamento dos dados com o planejamento estratégico da instituição; Simplicidade – opção de disponibilizar na forma de folder devido à funcionalidade do material; Confiabilidade – com a versão *web* a segurança dos dados do sistema informatizado foi garantida.

Com o objetivo de disponibilizar as informações geradas pelo conjunto de indicadores, é fundamental que as informações sobre o desempenho possam ser repassadas às partes interessadas e utilizadas nos processos decisórios. O guia referencial do MPOG⁵ sugere ainda algumas ferramentas para realizar a comunicação do desempenho, sendo as mais comuns: apresentação institucional de resultados para os colaboradores; um painel de indicadores com seus resultados; reuniões de avaliação de desempenho e relatórios anuais (físicos ou virtuais).

Este conjunto de indicadores deverá atender a processo de gestão de resíduos, seja no âmbito do acompanhamento do processo e execução de metas, como relatórios de análise crítica, tanto na prestação de contas como no planejamento estratégico da instituição.

A preocupação com a excelência da gestão se destaca atualmente como diferencial nas organizações, tornando-se preciso implantar continuamente boas práticas de gestão para tornar processos mais eficientes e gerar melhores resultados.

O monitoramento através dos indicadores ao longo dos anos permitirá sanar falhas como rotas mal planejadas e o mau dimensionamento de recursos materiais; além de permitir a identificação de pontos fortes e as oportunidades de melhorias, que devem ser objeto de aperfeiçoamento do gerenciamento interno dos resíduos gerados no Instituto.

AGRADECIMENTO

Isabella Fernandes Delgado é bolsista de produtividade do CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Brasília; 2006. 182p. [acesso 2014 dez 03]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/manuais/manual_gerenciamento_residuos.pdf].
2. Cardoso TAO, Kligerman DC, Nascimento VB, Miranda CF. Plano de gerenciamento de resíduos da Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.
3. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Decreto nº 7.404, de 23 de dezembro 2010. Regulamenta a Política Nacional de Resíduos Sólidos, cria...e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 dez. 2010. Seção 1. Edição Extra. p.63.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Saúde Ambiental e Gestão de Resíduos de Serviços de Saúde. Série F. Comunicação e Educação em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.
5. Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Guia referencial para medição de desempenho e Manual para Construção de indicadores. Brasília: MOPG; 2009.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 dez 2004. Seção 1, p.49-56.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especial. Hematologia e hemoterapia: Guia de manejo de resíduos. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
8. Brasil. Resolução Conama nº 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 04 mai. 2005. Seção 1. p. 63-65.
9. Brasil. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Dados do Brasil para a primeira avaliação regional 2002 dos serviços de manejo de resíduos sólidos municipais nos países da América Latina e Caribe. Brasília: OPAS/OMS; 2003.
10. Zamoner M. Modelo para avaliação de planos de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde (PGRSS) para Secretarias Municipais da Saúde e/ou Meio Ambiente. *Ciênc Saúde Coletiva*.2008;13(6):1945-52. [DOI:10.1590/S1413-81232008000600030].

Vibrio parahaemolyticus isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos

Vibrio parahaemolyticus isolated from fishes captured from the Lagoa dos Patos estuary

RIALA6/1649

Camile MILAN*, Débora Rodrigues SILVEIRA, Janaina Viana da ROSA, Cláudio Dias TIMM

*Endereço para correspondência: Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão, pr. 34, Pelotas, RS, Brasil, CEP: 96010-900. Tel: 53 3275-7216. E-mail: cami_milan@hotmail.com

Recebido: 20.03.2015 - Aceito para publicação: 26.05.2015

RESUMO

O estuário da Lagoa dos Patos é um importante polo pesqueiro artesanal por constituir área de criação de diversas espécies de peixes e crustáceos. Suas águas são influenciadas diretamente por fatores meteorológicos, os quais interferem na entrada de água oceânica no estuário e na vazão, refletindo na sua salinidade. Por esta razão, há a possibilidade de *V. parahaemolyticus* ser encontrado no estuário da lagoa e, conseqüentemente, nos pescados nele capturados, o que ofereceria risco aos consumidores. O objetivo do estudo foi de avaliar a presença de *V. parahaemolyticus* em pescados do estuário da Lagoa dos Patos, capturados e processados artesanalmente. Cinquenta e seis amostras de pescados oriundos do estuário da Lagoa dos Patos foram analisadas quanto à presença de *V. parahaemolyticus*. Três das cinco espécies analisadas, camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), tainha (*Mugil platanus*) e linguado (*Paralichthys orbignyanus*) albergavam o micro-organismo pesquisado. Estes resultados servem de alerta para a necessidade de maior fiscalização na produção de pescados, bem como da adoção de medidas higiênico-sanitárias que previnam o risco de transmissão deste patógeno para os consumidores. Este é o primeiro registro de isolamento de *V. parahaemolyticus* de *F. paulensis*, *M. platanus* e *P. orbignyanus*.

Palavras-chave. peixe, camarão, *Farfantepenaeus paulensis*, *Mugil platanus*, *Paralichthys orbignyanus*.

ABSTRACT

Lagoa dos Patos estuary is an important artisanal fishing pole because it represents an area for breeding several species of fish and shellfish. Water is directly influenced by meteorological factors, which interfere in the ocean water into the estuary and flow, reflecting on the salinity. For this reason, there is the possibility of *V. parahaemolyticus* be found in the lagoon estuary; consequently the fish caught from these place could offer risks to the health of consumers. The objective of this study was to evaluate the presence of *V. parahaemolyticus* in the Lagoa dos Patos estuary, and in the fishes captured from small-scale fishing and processing. Fifty-six samples of fish caught from the Lagoa dos Patos estuary were analyzed for the presence of *V. parahaemolyticus*. Three of five species analyzed, shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*), mullet (*Mugil platanus*) and sole (*Paralichthys orbignyanus*) harbored this microorganism. These results serve as a warning for providing the best technical oversight to the production of fish, and also the adoption of hygienic and sanitary measures to prevent the risk of transmission of this pathogen to consumers. This is the first report on the isolation of *V. parahaemolyticus* from *F. paulensis*, *M. platanus* and *P. orbignyanus*.

Keywords. fish, shrimp, *Farfantepenaeus paulensis*, *Mugil platanus*, *Paralichthys orbignyanus*.

INTRODUÇÃO

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria halofílica, encontrada principalmente durante o verão em águas salobras, que causa doenças gastrointestinais em humanos. O consumo de peixes, moluscos e crustáceos do mar crus ou mal cozidos tem sido a principal causa de contaminação por *V. parahaemolyticus* em humanos¹.

O Brasil é considerado um país propício à ocorrência de infecções causadas por *V. parahaemolyticus*. O clima tropical, com ampla costa marítima, e os hábitos alimentares, que incluem a ingestão de pescados consumidos crus em algumas regiões, são fatores que influenciam a ocorrência de casos. No extremo sul do Brasil, o estuário da Lagoa dos Patos é considerado um polo pesqueiro artesanal, devido à importante área de criação de diversas espécies de peixes e crustáceos, destacando-se no abastecimento de pescados na região². Dentre os pescados capturados no estuário explorados comercialmente, destacam-se o camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), a corvina (*Micropogonias furnieri*), a tainha (*Mugil latanus*), os bagres (principalmente *Genidens barbatus*), papa-terra (*Menticirrhus americanus*), o linguado (*Paralichthys orbignyanus*), a abrótea (*Urophycis brasiliensis*) e o peixe-rei (*Odontesthes argentinensis*)^{3,4}.

A Lagoa dos Patos possui uma interação estuário-oceano, que é influenciada diretamente por fatores meteorológicos, os quais interferem na entrada de água oceânica no estuário e na vazão, refletindo na sua salinidade⁵. Por esta razão, há possibilidade de *V. parahaemolyticus* ser encontrado no estuário da lagoa e, conseqüentemente, nos pescados nele capturados. Logo, o risco que pode acarretar para os consumidores e a falta de estudos sobre *Vibrio* na região, caracterizam a justificativa do estudo, que teve como objetivo avaliar a presença de *V. parahaemolyticus* em pescados do estuário da Lagoa dos Patos, capturados e processados artesanalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Cinquenta e seis amostras de pescados inteiros refrigerados foram coletadas aleatoriamente em peixarias e supermercados dos municípios de Pelotas e Rio Grande, RS. Todas as amostras eram provenientes de capturas realizadas no estuário da Lagoa dos Patos. As amostras foram coletadas conforme a disponibilidade das espécies capturadas e desembarcadas na época do ano em que o trabalho foi realizado, de abril de 2013 a fevereiro de 2014. Foram coletadas 10 amostras de corvina (*Micropogonias furnieri*), 10 de tainha (*Mugil platanus*), 20 de linguado (*Paralichthys orbignyanus*), 3 de bagre (*Netuma barba*) e 13 de camarão (*Farfantepenaeus paulensis*). As amostras foram colocadas em sacos estéreis e imediatamente encaminhadas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo, para a pesquisa de *V. parahaemolyticus*.

Pesquisa de *Vibrio* spp.

A pesquisa de *Vibrio* spp. foi realizada de acordo com U. S. Food and Drug Administration - FDA⁶, com modificações. Para a análise das amostras, foram utilizados as guelras e o fígado, no caso dos peixes, ou um conjunto de quatro camarões. O material foi colocado em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia), massageado por 5 minutos e incubado a 37 °C por 24 h para enriquecimento. A partir do material da superfície dessas culturas foram feitas sementeiras por esgotamento em ágar Tiosulfato Citrato Bili Sacarose (TCBS, Himedia) e incubação a 37 °C por 24 h para obtenção de colônias isoladas. Até três colônias típicas de cada placa foram semeadas novamente em APA e após a incubação a 37 °C por 24 h foram misturadas com 20 % de glicerol para manutenção de estoque a -70 °C. Os isolados foram recuperados em APA a 37 °C por 24 h, quando necessário.

Extração de DNA

Para extração dos DNAs dos isolados foi utilizada a técnica descrita por Sambrook e Russel⁷. O pellet obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em APA foi ressuscitado em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1 % (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Foram adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -20 °C por 1 h. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70 %. Após eluição em 40 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4), foi adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -20 °C.

Identificação de *V. parahaemolyticus*

Os isolados de *Vibrio* foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes *toxR*, para identificação de *V. parahaemolyticus*, conforme Bilung et al⁸, com modificações. Cada reação teve como volume final 20 µL. A mistura consistiu em 10 µL de Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brasil), 1 µL (10 pmol) de cada primer, ToxR-a

e ToxR-b, 1,2 µL de DNA e 6,8 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 (Techne), seguindo o programa: desnaturação inicial de 96 °C por 5 min, 20 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos *primers* a 63 °C por 1,5 min, extensão a 72 °C por 1,5 min e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,8 %. Como controle positivo, foi utilizado o DNA de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 e como controle negativo foi utilizado água pura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinquenta e seis amostras de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos foram coletadas e analisadas quanto à presença de *V. parahaemolyticus*. Três espécies albergavam o micro-organismo pesquisado (Tabela 1), sendo que os isolados de guelras e de fígados não eram dos mesmos peixes.

Apesar do clima com temperaturas mais amenas no sul do Brasil, *V. parahaemolyticus* foi isolado de número percentualmente maior de amostras tanto de camarões como de peixes, quando comparado a estudos realizados em outras regiões do Brasil.

Tabela 1. Pesquisa da presença de *Vibrio parahaemolyticus* em pescados capturados no ambiente estuarino da Lagoa dos Patos

Espécies	n*	Pescados positivos para <i>V. parahaemolyticus</i>		
		Fígado	Guelras	Total (%)
Tainha (<i>Mugil platanus</i>)	10	2	2	4 (40)
Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>)	10	0	0	0 (0)
Linguado (<i>Paralichthys orbignyanus</i>)	20	2	2	4 (20)
Bagre (<i>Genidens barbatus</i>)	3	0	0	0 (0)
Camarão (<i>Farfantepenaeus paulensis</i>)	13	-	-	6 (46,15)
Total	56			14 (25)

*: Número de amostras

V. parahaemolyticus foi isolado de quase 50 % das amostras de camarão, o que vai de encontro ao trabalho de Melo et al⁹, que isolou o micro-organismo de 20 % de 50 amostras de outra espécie de camarão (*Litopenaeus vannamei*) coletadas em supermercados de Natal, RN. Chen et al¹⁰, em um estudo com 112 amostras de atum coletados no comércio varejista em São Paulo/SP, encontraram três amostras positivas (2,68 %) para *V. parahaemolyticus*, diferentemente do nosso trabalho onde foram observadas 18,6 % de amostras de peixes contaminadas com o micro-organismo.

Todos os pescados analisados eram provenientes da Lagoa dos Patos, que troca água com o Oceano Atlântico através de um canal com 20 km de comprimento e 0,5 a 3 km de largura¹¹, o qual, durante os meses de verão, permite a entrada de água salgada na lagoa¹². No presente trabalho, *V. parahaemolyticus* foi isolado em todas as épocas do ano, sendo o verão a estação em que ocorreu com maior frequência (Figura 1). Este fato possivelmente possa ser justificado devido à temperatura ambiental, já que *V. parahaemolyticus* é encontrado mais comumente em climas tropical e temperado¹³.

Ramos et al¹⁴ pesquisaram *Vibrio parahaemolyticus* em 60 amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) em Santa Catarina,

encontrando o micro-organismo em 35 % das mesmas. Apesar de não haveramos coletado essa espécie de pescado em nosso trabalho, esse resultado comprova a presença de *Vibrio parahaemolyticus* no sul do Brasil.

Torres e Fernandez¹⁵ estudaram 57 amostras de frutos do mar (ostras frescas, peixes e camarões) coletadas durante um ano em Guadalajara, México, e observaram incidência de *V. parahaemolyticus* de 45,6 %, sendo 71,4 % em peixes, 44 % em ostras e 27,6 % em camarão. Os resultados obtidos no nosso trabalho foram semelhantes em relação à quantidade de *V. parahaemolyticus* isolados de camarão, mas com relação ao isolamento em peixes o percentual encontrado foi inferior. Isso possivelmente possa ser explicado pela diferença das regiões de origem dos pescados.

CONCLUSÃO

Os pescados das espécies *Mugil platanus*, *Paralichthys orbignyanus* e *Farfantepenaeus paulensis*, oriundos no estuário da Lagoa dos Patos, podem albergar *V. parahaemolyticus*. Estes resultados servem de alerta para a necessidade de maior fiscalização na produção de pescados, bem como da adoção de medidas higiênico-sanitárias que previnam o risco de transmissão deste patógeno para os consumidores.

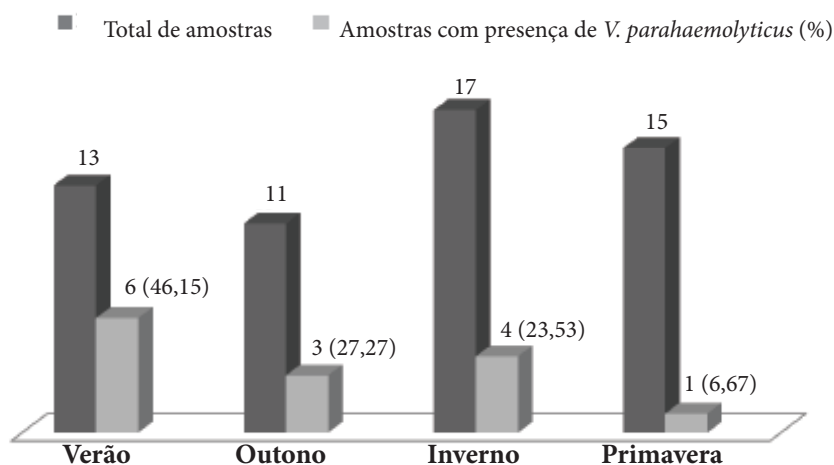


Figura 1. Relação da estação do ano com a presença de *Vibrio parahaemolyticus* em pescados capturados no ambiente estuarino da Lagoa dos Patos

REFERÊNCIAS

1. Heitmann IG, Jofre LM, Hormazabal OJC, Olea A, Vallebuona C, Valdes C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev Chil Infectol*.2005;22(2):131-40. [DOI: 10.4067/S0716-10182005000200003].
2. Reis EG. Pesca artesanal na Lagoa dos Patos: História e administração pesqueira. *In*: Alves FN. Por uma história multidisciplinar do Rio Grande. Rio Grande: FURG; 1999. p.81-4.
3. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. Desembarque de pescados no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: CEPERG/Ibama; 2002.
4. Leal LCN, Bemvenuti AM. Levantamento e caracterização dos peixes mais freqüentes no mercado público do Rio Grande. *Cad Ecol Aquat*.2006;1(1):45-61.
5. Möller O, Fernandes E. Hidrologia e hidrodinâmica. *In*: Seeliger U, Odebrecht C. (Ed.). O estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações. Rio Grande: FURG; 2010.
6. Kaysner CA, Depaola J. *Vibrio*.U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM). [Internet]. [acesso em 27 out 2014]. Disponível em: [<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>].
7. Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
8. Bilung ML, Radu S, Bahaman RA, Rahim AR, Napis S. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadarageanosa*). *Am J Immunol*.2005;1:31-6. [DOI: 10.3844/ajisp.2005.31.36].
9. Melo LMR, Almeida D, Hofer E, Reis CME, Theophilo GND, Santos AFM et al. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* marketed in Natal, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2011;42(4):1463-9. [DOI: 10.1590/S1517-83822011000400032].
10. Chen J, Balian SC, Telles EO. *Vibrio parahaemolyticus* in tuna (*Thunnus* spp.) traded in the city of São Paulo. *Vet Zootec*.2005;12:89-95.
11. Bonilha LE, Asmus ML. Modelo ecológico do fitoplâncton e zooplâncton do estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Publ ACIESP*.1994;87(1):347-62.
12. Anacleto EI, Gomes EAT. Relações tróficas no plâncton em um ambiente estuarino tropical: Lagoa dos Patos (RS), Brasil. *Saúde Amb Rev*.2006;1(2):26-39.
13. Magalhães V, Lima RA, Tateno S, Magalhães M. Human gastroenteritis associated with *Vibrio parahaemolyticus* in Recife, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*.1991;33:64-8.
14. Ramos RJ, Miotto LA, Miotto M, Junior NS, Cirolini A, Silva HS, et al. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and Waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. *Rev Soc Bras Med Trop*.2014;47(3):327-33. [DOI: 10.1590/0037-8682-0069-2014].
15. Torres MR, Fernandez E. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in rawfish, oysters and shrimp. *Rev Latinoam Microbiol*.1993;35(3):267-72.

Qualidade microbiológica de sanduíches de estabelecimentos com serviço tipo *delivery*

Microbiological quality of sandwiches of food establishments with delivery service

RIALA6/1650

Franciele Aparecida SANTANA¹, Michele Cristina VIEIRA¹, Uelinton Manoel PINTO^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 14, São Paulo, SP, Brasil, CEP 05508-900. Tel: 11 2648-0958, fax: 11 2648-0677. E-mail: uelintonpinto@usp.br

¹Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil

Recebido: 18.03.2015 - Aceito para publicação: 22.06.2015

RESUMO

Lanches prontos são produtos altamente consumidos em função do baixo preço, rapidez e comodidade. Contudo, as condições inadequadas de preparo e manipulação destes alimentos aumentam os riscos de contaminações microbiológicas. Objetivou-se examinar a qualidade microbiológica de sanduíches tipo hambúrguer quanto às contagens de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sulfito redutor, e bolores e leveduras. Foram avaliados 18 sanduíches de seis estabelecimentos localizados no município de Ouro Preto – MG. Das amostras analisadas, 56 % estavam em desacordo com os padrões estabelecidos para as contagens de aeróbios mesófilos, 67 % para coliformes totais, 6 % para *E. coli*, e 61 % apresentaram contagens elevadas de bolores e leveduras. Não foi detectada a presença de *Salmonella* sp.; e as contagens dos *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium* sulfito redutor foram abaixo do limite de detecção. Apesar da ausência ou baixa prevalência dos patógenos acima citados, as contagens elevadas de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, assim como de coliformes totais sugerem que há necessidade de efetuar a implantação das boas práticas de produção nos estabelecimentos avaliados, além de maior fiscalização por parte da vigilância sanitária do município.

Palavras-chave. hambúrguer, higiene, segurança alimentar, contaminação microbiológica.

ABSTRACT

Snacks are highly consumed products due to the low price, easy and fast preparation and convenience. However, the inadequate handling and preparation of these foods increase the risk for microbiological contamination. This study aimed at examining the microbiological quality of hamburgers by performing the counts of mesophilic aerobic bacteria, total coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, sulfite reducer *Clostridium*, and molds and yeasts. Eighteen samples were collected from six lunchrooms in the city of Ouro Preto - MG. Among the analyzed samples, 56 % were classified as unsatisfactory for mesophilic aerobic counts, 67 % for total coliforms counts, 6 % for *E. coli*, and 61 % for molds and yeasts. *Salmonella* sp. was not detected in any of the analyzed samples, and the CFU/g of *B. cereus*, *S. aureus* and sulfite reducer *Clostridium* were under the detection limit. Despite the absence or low prevalence of the above mentioned pathogens, the high counts of mesophilic aerobic bacteria, yeasts and molds, and total coliforms indicate the need for implementing the good manufacturing practices in the evaluated establishments, and an agenda by the government to increase the supervision from the sanitary surveillance center of the municipality.

Keywords. burger, hygiene, food safety, microbiological contamination.

INTRODUÇÃO

Em cidades universitárias o consumo de *fast-food* tornou-se hábito, devido ao valor acessível, bem como à rapidez do preparo e consumo destes alimentos, aliado ainda ao estilo de vida dos moradores desses locais, uma vez que universitários se reúnem para consumirem este tipo de lanche, podendo assim ter um momento de lazer junto ao seu grupo social¹.

Fatores como a escassez de tempo para o preparo e o consumo de alimentos, bem como a existência de alimentos prontos e diversificados que são comercializados em locais de fácil acesso, por um preço acessível, fazem com que a comida de rua também seja uma opção viável para uma boa parte da população². O surgimento dos serviços de entrega favorece ainda mais o consumo deste tipo de alimento.

Devido ao elevado consumo desses lanches por um grande número de pessoas, surge a preocupação com a segurança alimentar, uma vez que os produtos podem ser contaminados por micro-organismos patogênicos, devido às condições inadequadas do local de preparo e/ou à falta de conhecimento sobre técnicas de manipulação higiênica dos alimentos por parte dos comerciantes³.

Os micro-organismos podem contaminar alimentos em qualquer um dos estágios de produção, seja durante o beneficiamento, manuseio, processamento, acondicionamento, distribuição e/ou preparo para o consumo⁴. Entre as causas mais frequentes de contaminação dos alimentos destacam-se a manipulação inadequada dos mesmos, além da contaminação cruzada entre produtos crus e processados^{5,6}.

O consumo de alimentos contaminados por micro-organismos patogênicos pode levar o indivíduo a um quadro infeccioso ou a uma intoxicação alimentar⁷. Os sintomas mais comuns incluem dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia e febre, porém, o quadro clínico pode ser extremamente sério, com desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória, podendo levar inclusive à morte do indivíduo^{5,6}.

O aumento da procura por alimentos prontos para o consumo deve estar associado a um monitoramento rigoroso das condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos. O objetivo desta pesquisa foi realizar análises microbiológicas dos sanduíches do tipo hambúrguer comercializados em estabelecimentos com serviço *delivery* (entrega domiciliar) na cidade de Ouro Preto/MG, a fim de avaliar a sua qualidade e inocuidade para os consumidores. A escolha dos sanduíches do tipo hambúrgueres se deu pelo fato destes serem comumente pedidos em serviços tipo *delivery* na cidade e pela escassez de trabalhos realizados nesses locais. Na cidade escolhida, existem sete estabelecimentos, entre lanchonetes e padarias, que possuem alvará sanitário, mas não há uma informação exclusiva sobre o número de estabelecimentos com serviço do tipo *delivery*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP-MG). As amostras coletadas eram provenientes de estabelecimentos localizados na cidade de Ouro Preto/MG e foram analisadas de acordo com as características do alimento, conforme a Resolução RDC nº 12/2001 da ANVISA⁸ para a categoria “produtos de confeitaria, lanchonete, padarias e similares, doces e salgados - prontos para consumo”; na classificação “sanduíches quentes”. Em complemento, foram feitas as análises para determinação do número de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais e fungos e leveduras, conforme estudos realizados por Rodrigues et al³ e Kuhn et al⁹. As contagens de cada amostra foram realizadas em duplicata.

Material analisado e coleta das amostras

Foram avaliadas amostras de sanduíche composto por pão, bife de hambúrguer bovino, tomate e alface. Foi constatado que existem pelo menos 10 estabelecimentos que comercializam, entre outros produtos, sanduíches de hambúrguer e oferecem o serviço *delivery*.

Desse total, seis estabelecimentos foram avaliados por meio da análise de três amostras provenientes de cada um ($n = 18$). As amostras foram adquiridas em diferentes dias da semana para aumentar a possibilidade de detecção de variações. O recebimento das mesmas ocorreu no período de 07 de outubro a 13 de novembro de 2014, no horário de funcionamento dos estabelecimentos. Os atendentes não foram informados de que se tratava de uma pesquisa para avaliar a contaminação microbiológica dos sanduíches para assim, aproximar ao máximo das condições habituais de comercialização.

As amostras foram recebidas na Escola de Nutrição (ENUT- UFOP), por meio do serviço de entrega do próprio estabelecimento e, em seguida, levadas ao laboratório de Microbiologia de Alimentos, onde foram refrigeradas a 4 °C em suas embalagens comerciais originais, fechadas e intactas para posterior análise. As análises foram realizadas em no máximo 14 horas após a entrega.

Cada amostra foi identificada de acordo com o estabelecimento, de modo a manter o sigilo dos resultados, tendo sido nomeadas de (E) Estabelecimento e numeradas de 1 a 6.

Preparo de amostras

Cada amostra foi dividida em quadrantes, de modo a permitir a coleta de partes iguais de cada componente do alimento. Alíquotas de 25 g de cada sanduíche foram assepticamente pesadas e acondicionadas em sacos plásticos estéreis e homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada 0,1 % estéril, durante 60 segundos em aparelho homogeneizador de amostras (Marconi MA440®). Diluições seriadas foram feitas em solução salina 0,85 %.

Análises microbiológicas

As contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos, *Bacillus cereus*, *Clostridium* sulfito redutor, bolores e leveduras e a detecção de *Salmonella* sp. foram realizadas conforme a Instrução Normativa (IN) 62¹⁰.

As contagens de coliformes totais de *Escherichia coli* foram realizadas em placas Petrifilm™ EC, e a enumeração de *Staphylococcus aureus* em placas de Petrifilm™ STX, ambas conforme instruções do fabricante (3M Company, St. Paul, MN, EUA).

Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de alimento (UFC/g) ou presença/ausência para *Salmonella* sp. Os padrões microbiológicos adotados estão contidos na Tabela 1.

Tabela 1. Intervalo das contagens de micro-organismos avaliados em sanduíches de hambúrguer comparados aos padrões estabelecidos

Micro-organismos	Limite aceitável (UFC/g)	Intervalo de contagens encontradas (UFC/g)
Aeróbios mesófilos	10 ^{5b}	<10 ³ a 6,4 x10 ⁶
Coliformes totais	10 ^{2d}	<10 ¹ a 8 x10 ²
<i>E. coli</i>	10 ^{2a}	<10 ¹ a 1,7 x10 ²
<i>B. cereus</i>	10 ^{3a}	<10 ²
<i>S. aureus</i>	10 ^{3a}	<10 ¹
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência em 25 g ^a	Ausência em 25 g
<i>C. sulfito redutor</i>	10 ^{3a}	<10 ¹
Bolores e leveduras	10 ^{3c}	<10 ² a 2,5 x10 ⁴

^a Resolução RDC nº 12 de 2001 da ANVISA⁸ para amostra indicativa; ^b Rodrigues et al³; ^c Kuhn et al⁹; ^d Mesmo limite adotado para *Escherichia coli*, semelhantemente a Rodrigues et al³

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicaram a ocorrência de amostras com contagens altas para aeróbios mesófilos, coliformes totais e bolores e leveduras, os quais apresentaram valores acima dos limites adotados. Porém, quanto à avaliação de micro-organismos patogênicos como *B. cereus*, *Clostridium* sulfito redutor *Salmonella*, e *S. aureus*, foram obtidos níveis satisfatórios, o que permite classificar o alimento como adequado para o consumo, de acordo com a legislação brasileira (Tabela 1).

Foram observadas variações nos níveis de contaminação entre os estabelecimentos e também para um mesmo estabelecimento, quando comparados os valores das contagens em diferentes amostras (Tabela 2).

A contaminação por aeróbios mesófilos apresentou ampla faixa de contagem e limite máximo de $6,4 \times 10^6$ UFC/g (Tabela 2), resultando em 56 % das amostras em desacordo com o padrão estabelecido. Esse resultado contrasta com os valores de 98 % e 23 % de amostras não conformes encontradas por Little et al¹¹ e Kuhn et al⁹, avaliando bifés de hambúrguer e lanches tipo X-salada, respectivamente. A contagem elevada de bactérias mesofílicas em alimentos pode indicar uma situação de risco à saúde, contribuindo para tornar o alimento insalubre.

A contaminação do alimento nesses casos pode decorrer da baixa qualidade das matérias-primas, condições de processamento inadequado devido a fatores como higienização deficiente dos manipuladores, dos locais de manipulação ou de utensílios utilizados⁹.

A resolução RDC nº 12/2001⁸, que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos destinados ao consumo humano, não estipula padrões para micro-organismos aeróbios mesófilos. Além disso, não foi encontrado na literatura padrões de referência para aeróbios mesófilos específicos para sanduíches de hambúrguer com salada. Portanto, alimentos com contagem superior a 10^5 UFC/g foram considerados impróprios para o consumo, conforme limite adotado por Rodrigues et al³, ao avaliar amostras de cachorros-quentes.

Um total de 67 % das amostras estava em desacordo com o padrão adotado para coliformes totais. Essa frequência foi superior à encontrada por Rodrigues et al³, que analisando as condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de Pelotas, RS observaram a presença de níveis insatisfatórios em 53 % das amostras de cachorro- quente analisadas. Contagens elevadas de coliformes totais podem sugerir práticas de higienização e de manipulação inadequadas dos alimentos. Vale ressaltar que não é estabelecido pela legislação brasileira o padrão para coliformes totais em alimentos.

Tabela 2. Porcentagem de amostras classificadas como insatisfatórias e intervalo das contagens de micro-organismos avaliados por estabelecimento

Micro-organismos	*% Insat.	E1 (UFC/g)	E2(UFC/g)	E3 (UFC/g)	E4 (UFC/g)	E5 (UFC/g)	E6 (UFC/g)
Aeróbios mesófilos	56	$9,5 \times 10^3$ a $3,4 \times 10^4$	10^3 a $2,2 \times 10^5$	$1,62 \times 10^3$ a $5,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$ a $6,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^6$	$<10^3$ a $3,6 \times 10^4$
Coliformes totais	67	5×10^1 a $3,95 \times 10^2$	2×10^1 a $7,2 \times 10^2$	5×10^2 a $3,7 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$ a $4,6 \times 10^3$	$3,3 \times 10^2$ a $1,1 \times 10^3$	$<10^1$ a $7,9 \times 10^2$
<i>E. coli</i>	6	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$ a $1,65 \times 10^2$	$<10^1$	$<10^1$
<i>B. cereus</i>	0	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
<i>S. aureus</i>	0	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$
<i>Salmonella sp.</i>	0	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g
** <i>Clostridium</i> sulf. red.	0	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$
Bolores e leveduras	61	5×10^1 a $1,6 \times 10^3$	$<10^2$ a $2,46 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$ a $5,8 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$ a $2,3 \times 10^4$	5×10^2 a $1,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$ a 4×10^2

* Porcentagem de insatisfatórias; ** *Clostridium* sulfito redutor; E= estabelecimento

Verificou-se a ocorrência de uma amostra (5,5 %) em desacordo quanto à presença de *E. coli* em um dos estabelecimentos (Tabela 2), o que classifica a mesma como imprópria para consumo, de acordo com a legislação⁸ para contagem de coliformes termotolerantes, grupo do qual a *E. coli* faz parte. Rodrigues et al³ relataram que 25 % dos lanches avaliados apresentaram valores acima do limite aceitável. Em trabalho semelhante realizado em Cuiabá/MT, 88,6 % das amostras de sanduíche de hambúrguer avaliadas tiveram níveis de contaminação por coliformes termotolerantes acima dos considerados seguros pelas leis brasileiras¹². Porém, na presente investigação, as análises foram feitas especificamente para *E. coli*, diferenciação esta que não foi realizada em outros trabalhos. A enumeração de *E. coli* é importante pelo fato desse ser um micro-organismo de origem exclusivamente fecal.

No que se refere à contagem de bolores e leveduras, 61 % de amostras apresentaram contagens em desacordo com o padrão adotado (Tabela 2). Kuhn et al⁹ analisaram sanduíches tipo X-salada e verificaram que 85 % das amostras apresentaram-se fora do padrão higiênico considerado satisfatório. Altas contagens de bolores e leveduras indicam sanitização pobre no processamento do alimento ou uma seleção mal feita da matéria-prima, introduzindo produtos contaminados¹³.

Todas as amostras analisadas estavam em conformidade com os padrões estabelecidos para *Bacillus cereus* e *Clostridium* sulfito redutor (Tabela 2). Esses resultados são semelhantes aos encontrados previamente¹².

A análise de *S. aureus* demonstrou que 100 % das amostras encontravam-se de acordo com o padrão adotado (Tabela 2). A legislação brasileira preconiza a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, cujo limite está estabelecido em 10³ UFC/g, conforme o adotado na presente investigação. Os resultados encontrados indicam que esses micro-organismos não representaram motivo de preocupação, uma vez que todas as amostras apresentaram contagem abaixo do limite de detecção de 10¹ UFC/g. Esse resultado é melhor que o encontrado por outros autores^{9,12},

que relataram a ocorrência de amostras classificadas como insatisfatórias quanto ao número desses micro-organismos.

Não foi constatada a presença de *Salmonella* sp. em nenhuma das amostras analisadas (Tabelas 1 e 2), semelhante ao relatado para amostras de bife de hambúrguer no Reino Unido¹¹, bem como amostras provenientes do Rio Grande do Sul³.

Constatou-se que os níveis mais altos de contaminação foram encontrados no estabelecimento E4, seguido do E3 e E5; tendo sido mais expressivas as contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e fungos; contudo foi verificada ainda a presença de *E. coli* ao analisar uma das amostras do estabelecimento E4 (Tabela 2). O estabelecimento E6 mostrou melhores resultados, apresentando todas as amostras em conformidade com os padrões adotados. Bons resultados também foram encontrados nos estabelecimentos E1 e E2 (Tabela 2).

Destaca-se que a adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPFs) deve ser enfatizada e efetivamente cobrada pela fiscalização do município, a fim de garantir a integridade e inocuidade dos alimentos. As BPFs orientam os manipuladores de alimentos quanto à importância da higiene no processamento, elaboração, manipulação, armazenamento e distribuição dos produtos. Além do mais, as BPFs auxiliam na melhoria da qualidade dos produtos e do ambiente de trabalho, na diminuição de reclamações por parte dos consumidores e no aumento da motivação e produtividade dos funcionários. Programas de treinamentos para manipuladores de alimentos são meios eficazes para transmissão desses conhecimentos e promoção de melhorias nas condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos alimentícios. Os manipuladores de alimentos devem ser supervisionados e capacitados periodicamente em higiene pessoal, manipulação higiênica dos alimentos e doenças veiculadas por alimentos, a fim de reduzir os riscos de contaminação¹⁴. O papel da universidade e de outros setores públicos na disseminação desses conhecimentos se faz proeminente.

CONCLUSÃO

Apesar da ausência dos patógenos avaliados, as contagens elevadas de aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, assim como de coliformes totais sugerem falhas nos processos de higiene e no controle de qualidade durante o processamento, bem como a existência de condições para o desenvolvimento de patógenos. Esses resultados indicam a necessidade de implantação das boas práticas de produção nos estabelecimentos avaliados, além da adoção de programas de treinamento de manipuladores no município.

REFERÊNCIAS

1. Furlaneto L, Kataoka AFA. Análise microbiológica de lanches comercializados em carrinhos de ambulantes. *Lecta*.2004;22(1/2):49-52.
2. Cardoso RCV, Santos SMC, Silva EO. Comida de rua e intervenção: estratégias e propostas para o mundo em desenvolvimento. *Ciênc Saúde Coletiva*.2009;14(4):1215-24. [DOI: 10.1590/S1413-81232009000400027].
3. Rodrigues KL, Gomes JP, Conceição RCS, Brod CS, Carvalho JB, Aleixo JAG. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. *Ciênc Tecnol Aliment*.2003;23(3):447-52. [DOI: 10.1590/S0101-20612003000300026].
4. Lima AWO, Sousa CP. Infecções e intoxicações alimentares. *In: Aspectos da Ciência e Tecnologia de Alimentos*. João Pessoa: Nova Ideia; 2002. p.175-99.
5. Carmo GMI, Oliveira AA, Dimech CP, Santos DA, Almeida MG, Berto LH, et al. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. *Bol Eletr Epidemiol*.2005;5(6):1-7.
6. Murmann L, Santos MC, Longaray SM, Both JMC, Cardoso M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J Microbiol*.2008;39(3):529-34. [DOI: 10.1590/S1517-838220080003000024].
7. de Novaes Oliveira M, Brasil ALD, Taddei JAAC. Avaliação das condições higiênico-sanitárias das cozinhas de creches públicas e filantrópicas. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2008;13(3):1051-60. [DOI:10.1590/S1413-81232008000300028].
8. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 10 jan. 2001.
9. Kuhn CR, Gandra EA, Ferreira LR, Bartz J, Gonzáles AP, Gayer CF. Qualidade microbiológica de lanches comercializados na cidade Pelotas-RS. *Gl Sci Technol*.2012;5(3):1-10.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 set. 2003.
11. Little CL, Gillespie IA, Mitchell RT. Microbiological examination of ready-to-eat burgers sampled anonymously at the point of sale in the United Kingdom. *Commun Dis Public Health*.2001;4(4):293-9.
12. Bezerra ACD, Reis RBD, Bastos DHM. Microbiological quality of hamburgers sold in the streets of Cuiabá-MT, Brazil and vendor hygiene-awareness. *Ciênc Tecnol Aliment*.2010;30(2):520-4. [DOI: 10.1590/S0101-20612010000200035].
13. Rodrigues PM. Bolores termorresistentes. *In: Rodrigues PM. Microbiologia dos Processos Alimentares*. São Paulo: Varela; 2005. p.103-19.
14. Takahashi CC, Amaral PE, Santos LCL, Contim JD, Pinto UM, Neves CVB, et al. Avaliação do treinamento de manipuladores de alimentos de restaurantes comerciais pelo ensaio ATP-bioluminescência. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2013;72(4):302-8.

Avaliação das Boas Práticas de Manipulação no fluxograma operacional de preparações cárneas servidas em uma unidade de alimentação e nutrição

Evaluation of Good Manufacturing Practices in an operational flow chart of meat preparations served in a food and nutrition unit

RIALA6/1651

Bruna Garcia Alves FILGUEIRAS¹, Adriana Hocayen de PAULA¹, Wagner Miranda BARBOSA¹, Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ², Erika Madeira Moreira da SILVA^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Departamento de Educação Integrada em Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Avenida Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil, CEP: 29040-090. Tel: 27 99853-6476. E-mail: erika.alimentos@gmail.com

¹Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil

Recebido: 14.04.2015 - Aceito para publicação: 23.06.2015

RESUMO

O mercado da alimentação coletiva cresceu nas últimas décadas, influenciado pelas diversas mudanças ocorridas na sociedade. Ao mesmo tempo em que houve o crescimento da utilização dos serviços de alimentação coletiva, verificou-se aumento na ocorrência de doenças de origem alimentar, influenciado por práticas inadequadas de manipulação. Deste modo, o objetivo deste estudo foi de avaliar as boas práticas de manipulação relacionadas ao fluxograma operacional de preparações cárneas servidas em uma Unidade de Alimentação e Nutrição. Como instrumento de avaliação foi utilizada uma lista de verificação (*check-list*), baseada na legislação vigente. Além disso, foram aferidas as temperaturas durante a distribuição de 12 preparações cárneas servidas como prato principal. A média de adequações evidenciadas por meio da aplicação da lista de verificação foi igual a 46 %, sendo a maior parte das inadequações encontradas nas instalações da unidade. Em relação à distribuição, verificou-se que o balcão térmico da unidade não era capaz de manter os alimentos em temperatura segura para o consumo. Entretanto, as preparações não foram expostas por tempo prolongado. Percebe-se a necessidade da implantação de ações corretivas a fim de minimizar os possíveis riscos encontrados na unidade avaliada.

Palavras-chave. alimentação coletiva, doenças veiculadas por alimentos, carnes, boas práticas.

ABSTRACT

The collective food market has grown in recent decades, influenced by the various changes occurred in the society. While the use of collective food service has been expanded, an increase in the occurrence of food-borne diseases has noticed, derived from the inappropriate handling practices. The present study aimed at evaluating the good handling practices, in particular on the hygienic sanitary conditions of the operational flow chart for preparing meat served in a food and nutrition unit. For evaluating the hygienic sanitary conditions in this unit, a check-list based on the current legislation was applied for six times. Also, the temperatures were measured during the distribution of 12 meat preparations which were served as main course. By applying the check-list, the adequacy of this unit was 46 %, and the majority of the inadequacies were found in the restaurant facilities. Regarding the distribution process, the thermal counter of the unit showed inability in keeping the foods at a safe temperature to be consumed; nevertheless these foods were not exposed for a long time. It is important to point out that the corrective actions should be implemented to minimize the potential hazards found in the evaluated unit.

Keywords. collective food service, food-borne diseases, meat, good practices.

INTRODUÇÃO

Atualmente a escolha dos consumidores por refeições mais convenientes influenciou o mercado da alimentação coletiva. Além da praticidade, a alimentação institucional por meio do autosserviço oferece refeições variadas e de baixo custo, permitindo ao consumidor compor o prato, de acordo com a preferência¹.

Em contrapartida ao crescimento nos serviços de alimentação, houve também um aumento na ocorrência de doenças de origem alimentar, visto que em grandes estabelecimentos, o preparo de alimentos com antecedência, em grandes volumes e processamento térmico insuficiente favorecem a ocorrência de toxinfecções².

Registros epidemiológicos revelam que a maioria dos surtos de doenças de origem alimentar diagnosticados é atribuída a patógenos veiculados por alimentos preparados nesses locais. Ainda que o número de surtos registrados seja subestimado, sua relevância é reconhecida³.

A carne apresenta composição química que a faz ser um excelente meio de cultura para a proliferação microbiana, sendo considerada como o alimento mais perecível dentre os grupos alimentares. As carnes possuem elevado teor de água, pH favorável, assim como aminoácidos, peptídeos, nucleotídeo e açúcares que servem de substratos para a multiplicação de inúmeros contaminantes e/ou patógenos, podendo acarretar danos a saúde⁴. De acordo com Fernandez et al⁵, dos diversos alimentos que, frequentemente aparecem relacionados a surtos de intoxicação alimentares, destacam-se a carne bovina e a de frango, pois são responsáveis pela veiculação, principalmente, de clostrídios, estafilococos e enterobactérias.

Considerando que as Boas Práticas de Manipulação (BPM) contribuem para a qualidade e segurança dos alimentos e, consequentemente, a saúde do consumidor, o presente estudo teve por objetivo avaliar as boas práticas na linha de produção de preparações cárneas de uma Unidade de Alimentação e Nutrição, bem como a relação tempo e temperatura das preparações cárneas durante sua distribuição.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em uma Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN) localizada no município de Alegre, Espírito Santo. Foram acompanhadas as etapas de preparo das preparações cárneas oferecidas no horário do jantar, desde o recebimento até a distribuição, de forma a verificar as Boas Práticas de Manipulação, bem como a relação binômio tempo/temperatura das preparações. Foi acompanhado o preparo de doze amostras, quatro para cada uma dos três tipos de preparações a base de carnes ofertadas pela unidade, sendo estas: carne de boi, de frango e de porco.

A avaliação das Boas Práticas de Manipulação no fluxograma operacional das preparações cárneas ocorreu por meio da aplicação da lista de verificação (*check-list*), baseada nas Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) nº 275 de 21 de outubro de 2002 e nº 216 de 15 de setembro de 2004^{6,7}. Esta lista foi aplicada por seis vezes durante o mês de março de 2011. Foram abordados 100 itens, distribuídos nos seguintes grupos de observação: recebimento, armazenamento, manipulação e distribuição, incluindo a avaliação da temperatura.

As opções de resposta da lista de verificação foram: “SIM” - quando o estabelecimento atendeu ao item observado, “NÃO” - quando o mesmo apresentou não-conformidade e “NÃO SE APLICA” - quando o item não foi pertinente à realidade local.

A temperatura das preparações foi aferida utilizando um termômetro de inserção de ponta aguda (Qualitats-Erzeugnis) com leitura na faixa entre -50 °C e 300 °C, higienizado com álcool 70 % antes e após cada medição. Este foi inserido no centro geométrico da preparação e a leitura, realizada em duplicata, feita após 1 min de contato com o alimento. As temperaturas foram aferidas em quatro momentos: logo após a cocção (espera para distribuição), no início da distribuição, durante a distribuição e ao final da distribuição.

O restaurante foi classificado com base nos critérios estabelecidos pela Resolução RDC nº 275, de 2002⁶, em três grupos de análise, de acordo com o percentual de adequação dos itens avaliados: Grupo I - 76 a 100 % de atendimento dos itens, Grupo II - 51 a 75 % de atendimento e Grupo III - 50 % ou menos de atendimento.

A Unidade de Alimentação e Nutrição contava com 22 funcionários, sendo dois destes responsáveis pelo açougue. O cardápio da unidade era constituído de um tipo de prato principal e uma opção, além da opção de ovos. O horário de funcionamento do almoço era de 10:30 à 13:00 h, enquanto a distribuição do jantar de 17:30 à 18:30 h. O restaurante servia em torno de 1000 refeições por dia sendo que, no jantar eram servidas aproximadamente 240 refeições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação geral, o percentual de adequação da Unidade de Alimentação foi de 46 %, classificando-a no Grupo III. Como demonstrado na Figura 1, o item recebimento apresentou 67 % de adequação, diferindo das demais etapas, com percentuais de adequação inferiores, entre 25 e 40 %.

Recebimento

Durante o recebimento de gêneros, ocorria a verificação do veículo quanto ao atendimento às normas higiênicossanitárias de transporte de gêneros alimentícios, a presença de equipamento para controle de temperatura e o transporte exclusivo de alimentos. Além disso, era verificada a uniformização dos funcionários e a adequada identificação da empresa no crachá e no veículo. Em todo recebimento eram avaliadas as características sensoriais do produto, integridade, conferência do peso do alimento solicitado e do peso real recebido, rotulagem, data de validade e nota fiscal da entrega. Entretanto, para a realização da entrega do produto, a unidade não apresentava local apropriado, protegido e isolado da área de preparo, além de não ocorrer a verificação das temperaturas dos produtos entregues, conforme recomendado pela legislação vigente⁷.

No estudo de Campos et al⁸ em restaurantes do tipo *self-service* no município de Alfenas/MG, também foram encontrados elevados percentuais de não conformidades relacionadas ao recebimento de alimentos. Para que este processo ocorra de forma adequada, é recomendável que aconteça em uma área que possibilite a transferência de mercadorias sem oferecer risco de contaminação. É necessário observar as condições higiênicas do veículo do fornecedor e do entregador, bem como

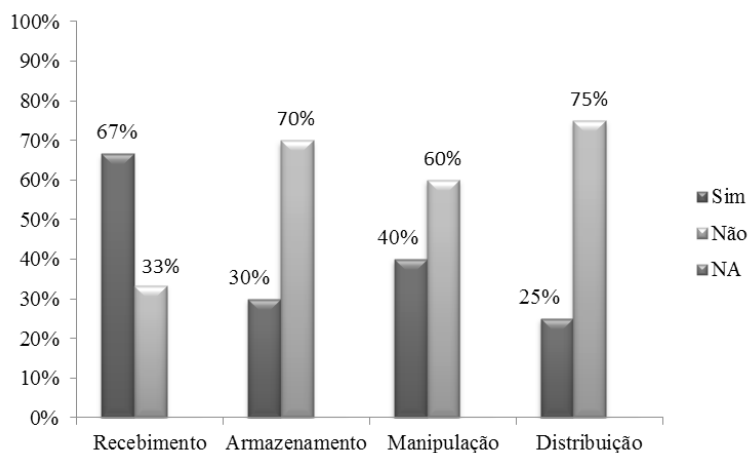


Figura 1. Percentual de adequação das condições higiênicossanitárias do fluxograma de carnes servidas na Unidade de Alimentação e Nutrição, por item de avaliação

analisar a compatibilidade do pedido com a nota fiscal, verificando principalmente detalhes como peso e custos. Deve-se verificar também a integridade do produto e da embalagem, temperatura, identificação correta e características sensoriais do produto.

De acordo com Cardoso et al⁹, na cadeia produtiva de alimentos, a obtenção da matéria-prima de boa qualidade, com a procedência garantida pelos órgãos de inspeção, é considerada requisito para a garantia da qualidade e da inocuidade do produto final. Além disso, está relacionada à saúde dos comensais, uma vez que alimentos de procedência indeterminada não passam por inspeção sanitária ou registro em órgãos públicos, procedimento que visa ao controle dos produtos e têm o intuito de garantir que o alimento esteja próprio para o consumo.

A aquisição de produtos de origem animal necessita de cuidados, principalmente no que diz respeito às condições de transporte e armazenamento, pois estes podem estar ou serem contaminados por micro-organismos patogênicos durante essa atividade, sendo indispensável uma rígida fiscalização¹⁰.

Armazenamento

A unidade possuía uma única câmara frigorífica para armazenar os três tipos de carnes oferecidas, a qual não se encontrava em bom estado de conservação. Não foram evidenciadas planilhas para o controle diário das temperaturas, sendo que o termostato na ocasião estava danificado. O espaço disponível era reduzido de forma a impedir a adequada organização dos gêneros e a devida troca de embalagens de papelão por caixas plásticas limpas. Entretanto, eram respeitadas as ordens de prazo de validade e de entrada das matérias-primas. No trabalho de Ferreira et al¹¹, os itens que apresentaram maior porcentagem de não conformidade foram rotulagem e armazenamento do produto final (22,2 %) e controle de qualidade do produto final (33,3 %) devido à falta de análise do produto final e falta de laudos laboratoriais.

Nos invólucros dos alimentos pré-preparados ou preparados faltavam algumas informações importantes como a data de preparo e o prazo de validade. Porém, mesmo com a falta de organização no interior da câmara, todos os gêneros eram dispostos sobre prateleiras ou paletes.

Logo após o recebimento, as carnes devem ser imediatamente armazenadas em câmaras próprias e organizadas. As matérias-primas, os ingredientes e as embalagens devem ser armazenados sobre paletes, estrados e ou prateleiras, respeitando-se o espaçamento mínimo necessário para garantir adequada ventilação, limpeza e, quando for o caso, desinfecção do local⁷.

Manipulação

As irregularidades evidenciadas nesta etapa devem-se em parte às condições relacionadas à estrutura e organização encontrada na área destinada ao pré-preparo das carnes. Este setor não possuía separação física do restante da unidade e nem possuía climatização, sendo todas as atividades executadas em temperatura ambiente. A sala de pré-preparo deve ser fechada e climatizada de forma a alcançar a temperatura adequada (entre 16 °C e 20 °C) para o resfriamento e manipulação antes do preparo final¹². Dada a condição climática da região, a temperatura ambiente na média anual pode atingir 30 °C. Além disso, as áreas de preparo e de armazenamento não possuíam portas ou qualquer outro sistema que mantivesse essas áreas livres de contaminação cruzada.

Na unidade em estudo, o descongelamento era realizado sob temperatura ambiente. O processo se iniciava com a retirada das peças de carne da câmara de congelamento dois dias antes de serem distribuídas aos comensais, e permaneciam até o dia seguinte para ser encaminhada ao pré-preparo e levada em seguida para câmara de resfriamento, para finalmente, no terceiro dia ser preparada e servida. Sabe-se que a etapa de descongelamento deve ser efetuada em condições de refrigeração em temperatura inferior a 5 °C ou em forno micro-ondas, quando o alimento for submetido imediatamente à cocção⁷.

Os funcionários estavam devidamente uniformizados, com roupas brancas, toucas descartáveis e sapatos antiderrapantes. Entretanto, alguns utilizavam adornos e possuíam uniformes e aventais em condições de limpeza insatisfatórias. No momento do pré-preparo e preparo, foram observadas conversas excessivas entre os funcionários. Estes executavam a lavagem das mãos antes do contato com os alimentos, entretanto esta atividade não era executada frequentemente, em especial quando havia troca de contato com outros alimentos. Não foi evidenciada a presença de cartazes com informações acerca da lavagem correta das mãos e demais hábitos de higiene.

Alguns funcionários que manipulavam as carnes não utilizam equipamentos de proteção individual como luvas metálicas. Durante o preparo das refeições não havia controle das temperaturas das preparações cárneas, nem das demais preparações servidas.

A manipulação é uma etapa que oferece grande risco de contaminação, sendo responsável por 24 % dos surtos de toxinfecção alimentar¹³. Uma das possíveis causas seria a falta da verificação e do controle de tempo e temperatura no preparo dos alimentos. Não há uma total garantia que todas as carnes submetidas à cocção atinjam no mínimo 70 °C no centro geométrico⁷, se não houver um controle adequado e sistemático.

Distribuição e temperatura das preparações cárneas

A relação tempo/temperatura, higiene dos manipuladores e utensílios são fatores importantes que devem ser considerados na etapa de distribuição. O balcão térmico da unidade encontrava-se em inadequado estado de conservação e funcionamento, o que impossibilitava o controle da temperatura do mesmo. A temperatura ideal a ser mantida no balcão é de 80 °C a 90 °C¹², o que não foi observado na unidade, a qual apresentou no momento da distribuição a temperatura de 74 °C. Vale ressaltar que o balcão de distribuição não oferecia nenhuma barreira física, como um vidro aparador que separa o comensal da preparação.

Esses fatos fizeram com que essa etapa obtivesse apenas 25 % dos itens em adequação.

O principal objetivo dos balcões térmicos durante a distribuição dos alimentos é fornecer as preparações em temperatura agradável, além de manter condição segura sob o ponto de vista microbiológico. Para maior segurança no tempo de exposição, é necessário que o equipamento de distribuição esteja sob temperatura controlada, em adequado estado de conservação e funcionamento⁷. De acordo com a RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004⁷, após passarem pela cocção, os alimentos preparados devem ser mantidos em condições de tempo e de temperatura que não favoreçam a multiplicação microbiana. Para conservação a quente, os alimentos devem ser submetidos à temperatura superior a 60 °C por, no máximo, 6 (seis) horas.

Dentre as preparações avaliadas, as que atingiram as temperaturas mais elevadas, durante o preparo, foram a carne bovina moída (92 °C), estrogonofe de frango (85,2 °C) e apenas uma preparação (picadinho de carne de porco) não atingiu o valor mínimo de 70 °C (Figura 2). A temperatura de cocção é um fator fundamental no controle das condições sanitárias do alimento. De acordo com a Resolução RDC nº 216 de 2004⁷, o tratamento térmico deve garantir que todas as partes dos alimentos atinjam a temperatura de no mínimo 70 °C.

Em relação ao tempo e temperatura das preparações cárneas, nota-se que poucas amostras conseguiram manter a temperatura acima de 60 °C, até o final da distribuição. Mesmo tratando-se de valores reduzidos, não se pode afirmar que as preparações encontravam-se em condições inadequadas, visto que o tempo de exposição não ultrapassou uma hora¹³. Consta na RDC nº 216 de 2004⁷ que a temperatura do alimento preparado deve ser reduzida de 60 °C a 10 °C em até duas horas. Segundo Rodrigues et al¹⁴, os balcões térmicos durante a distribuição dos alimentos devem fornecer as preparações em temperatura agradável, além de manter condição segura sob o ponto de vista microbiológico. Para maior segurança no tempo de exposição, é necessário que o equipamento de distribuição esteja sob

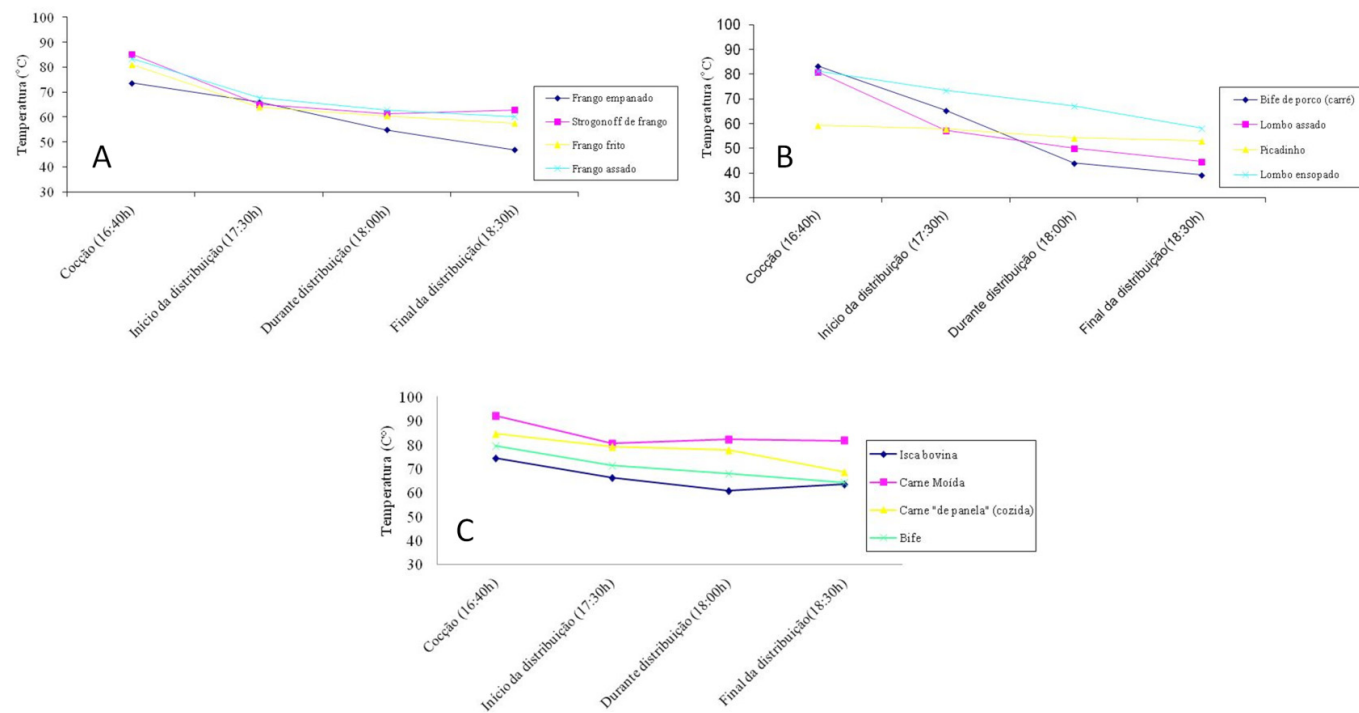


Figura 2. Tempo e temperatura durante a distribuição das preparações cárneas servidas como prato principal na Unidade de Alimentação e Nutrição (A: carne de frango; B: carne suína; C: carne bovina)

temperatura controlada, em adequado estado de conservação e funcionamento. Soares et al¹⁵ analisaram a relação tempo/temperatura de preparações quentes de um Restaurante Universitário relataram que 66,7 % dos pratos a base de carnes apresentaram temperatura superior a 60 °C. Além disso, observaram que em 10 % dos casos em que a temperatura da carne esteve insuficiente, a mesma manteve essa inadequação até o fim do preparo.

CONCLUSÃO

Após o acompanhamento do fluxograma operacional das preparações cárneas, pôde-se verificar que no açougue da unidade, bem como em todo restante da unidade, foram evidenciadas condições inadequadas quanto à estrutura física, o que pode colaborar para o risco de contaminação durante a produção das carnes. Observou-se inadequações quanto à recepção e armazenamento dos gêneros, bem como práticas inadequadas dos manipuladores

durante a preparação das carnes. Além disso, observou-se a falta do controle e registro do tempo e da temperatura em todas as etapas, em especial durante a distribuição. Sugere-se assim, a implementação de um monitoramento mais eficiente com relação à aplicação das boas práticas de manipulação de alimentos, contemplando a confecção de Procedimentos Operacionais Padronizados, registros de controle de temperatura/tempo, assim como da limpeza, a fim de minimizar pontos críticos durante a produção. Durante a pesquisa, não foi observado em momento algum, a realização de treinamentos. Esta prática se torna bastante eficaz quando executada de forma frequente nas unidades. Além disso, sugere-se melhorias na estrutura física, para que o fluxograma operacional de todas as preparações servidas esteja de acordo com a legislação vigente para a unidade de alimentação e nutrição estudada. Desta forma, destaca-se a importância do controle operacional de todas as preparações como uma forma de evitar prejuízos uturos à saúde dos comensais.

O fornecimento de refeições saudáveis e seguras do ponto de vista higiênicossanitário garante, além da manutenção, a recuperação da saúde dos comensais, o desenvolvimento de hábitos alimentares saudáveis, a conveniência e o contato social, sendo de extrema importância para a saúde e o bem-estar da população.

REFERÊNCIAS

1. Bezerra IN, Sichieri R. Características e gastos com alimentação fora do domicílio o Brasil. *Rev Saúde Pública*.2010;44(2):221-9.[DOI: 10.1590/S0034-89102010000200001].
2. Stangarlin L, Delevati MTS, Saccol ALF. Vigência da RDC 216/04 para serviços de alimentação do centro de Santa Maria, RS - 1ª parte. *Hig Alim*.2008; 22(166/167):20-3.
3. Mendes RA, Azeredo RMC, Coelho AIM, Oliveira SS, Coelho MSL. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. *Rev Nutr*. 2004;17(2):255-61. [DOI: 10.1590/S1415-52732004000200012].
4. Santos DA, Pires KCM, Silva NC, Maia MM, Oliveira EA, Souza PA. Avaliação do crescimento de *Staphylococcus aureus* em músculo bovino sob diferentes formas de descongelamento e tempos de congelamento. *Hig Alim*.2009;23(168/169):124-8.
5. Fernandez ARM, Sampaio AAM, Henrique W, Oliveira EA, Tullio RR, Perecin D. Características da carcaça e da carne de bovinos sob diferentes dietas, em confinamento. *Arq Bras Med Vet Zootec*.2008;60(1):139-47.
6. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 275 de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 out. 2003.
7. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 216 de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 set. 2004.
8. Campos MCB, Nicodemo TC, Weber ML. Boas práticas em restaurantes do tipo self – service: situação no município de Alfenas – MG. *Hig Alim*. 2013;27(222/223):51-5.
9. Cardoso RCV, Góes JAW, Almeida RCC, Guimarães AG, Barreto DL, Silva SA et al. Programa nacional de alimentação escolar: há segurança na produção de alimentos em escolas de Salvador (Bahia). *Rev Nutr*. 2010;23(5):801-11. [DOI: 10.1590/S1415-52732010000500010].
10. Gandra EA, Gandra TKV, Silva WP, Carvalho CV, Bezagio RC. Condições higiênico-sanitárias de produtos cárneos e de salas frigoríficas de supermercados do município de Umuarama, PR. *Hig Alim*. 2009;23(168/169):129-33.
11. Ferreira MA, São José JFB, Tomazini APB, Martini HSD, Milagres RCM, Pinheiro-Sant'Ana HM. Avaliação da adequação às boas práticas em unidades de alimentação e nutrição. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(2):230-5.
12. Associação Brasileira das Empresas de Refeição Coletivas - ABERC. Manual de práticas de elaboração e serviço de refeições para coletividades. 10ª ed. Paraíso: São Paulo; 2013.
13. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. Portaria CVS, 5 de 09 de abril de 2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo. Diário Oficial [do] Estado de São Paulo. São Paulo, SP, 19 abr. 2013. Seção I, nº73, p. 32-5.
14. Rodrigues FA, Nascimento DA, Cavichioli D, Souza AM. Identificação de pontos críticos de controle de preparações protéicas, em uma unidade de alimentação e nutrição. *Hig Alim*.2011; 25(192/193):49-55.
15. Soares ADN, Monteiro MAM, Shaefer MA. Avaliação do binômio tempo-temperatura em preparações quentes de restaurante universitário. *Hig Alim*. 2009;23(174/175):36-41.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional.

A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

Política Editorial

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores.

Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>), além dos critérios éticos da pesquisa humana e animal.

Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde – Conselho Nacional da Saúde, em caso de ética humana, e pela Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA de 2013 e pelas Resoluções Normativas N° 12, N° 13 e N° 14 no caso de experimentação animal. A pesquisa deverá ser aprovada por comissão de ética humana (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS), bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponíveis em: <http://bvsmodeo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. No caso de experimentação animal o projeto deverá ser aprovado por Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) reconhecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Ministério de Ciência e Tecnologia e Inovação (CONCEA). O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei federal 6638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

Informações Gerais

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-000

Ou por meio eletrônico em rial@saude.sp.gov.br

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

1. Categoria De Artigos

1.1 Artigos Originais: Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

Informações Complementares:

- ◆ Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 Artigos de Revisão: Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

- ◆ Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

1.3 Comunicações Breves: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

Informações complementares:

- ◆ Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- ◆ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

1.4 Notas Científicas: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

- ◆ Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- ◆ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 Relatos de Caso: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

- ◆ Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- ◆ Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 Resumos de Teses e Dissertações: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- ◆ Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- ◆ Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. Apresentação do manuscrito: Os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 Página de Identificação: Deve constar:

Título em português e em inglês: O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

Autores: De acordo com o International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icmje.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

Afiliação: Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 Preparo do manuscrito:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no Medical Subject Headings (MeSH). Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 Citação no texto: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06¹, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)^{2,3}.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 Referências: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Medline, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:

Artigos de periódicos:

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. Rev Inst Adolfo Lutz. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. J Am Oil Chem Soc. 1977;54:36-40.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. Cad Saude Coletiva [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

Livros:

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington (DC): The Institute; 1992. Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras - PB: Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [<http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doci>].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].

Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to eletrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver), disponível em: <http://www.cmje.org>. Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 Números de figuras e tabelas: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como quadros, gráficos etc.

A) Tabelas: Devem ser redigidas em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

B) Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos <u>Agradecimentos</u>	Autor responsável	Aprovação
Transferência de Direitos Autorais	Todos	Aprovação

3. Declarações e documentos solicitados: Em conformidade com as diretrizes do International Committee of Medical Journal Editors, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável.

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

- ♦ Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para mais informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).
- ♦ Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- ♦ Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL.

4. Verificação dos itens exigidos na submissão:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras Times New Roman, corpo 12, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).

4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
10. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

5. Revisão da redação científica: Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

6. Provas: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (portable document format). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

7. Publicação e distribuição: Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.



Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA
DA SAÚDE

