

EFICÁCIA DE SANITIZANTES UTILIZADOS EM UNIDADES DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO (UAN'S) SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Data de aceite: 02/06/2023

Angélica Aparecida Vieira Adami

Josylene Machado Dos Santos

Leilane Lima Gomes

RESUMO - Os alimentos são, para nosso corpo, a fonte de energia necessária para sobrevivência. Mas é sabido que a forma de preparo e manuseio destes alimentos pode ocasionar danos a saúde, dependendo da maneira e do local em que preparamos. As superfícies em geral, quando mal higienizadas, permitem que os resíduos se transformem em fontes de energia para a multiplicação de microrganismos, como bactérias e fungos. Assim, uma higienização deficiente de bancadas e dos equipamentos podem levar à transmissão de doenças, além de permitir a aderência bacteriana às superfícies, levando a formação do biofilme. O objetivo desta pesquisa foi avaliar, por meio de uma metodologia qualitativa de experimentação, prospectivo e descritivo, a eficiência de diferentes tipos e marcas de sanitizantes utilizados em Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN's), frente a quatro tipos de bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Bacillus cereus* e *Salmonella choleraesuis*. Seis soluções sanitizantes foram testadas, sendo que duas destas tinham em sua composição o hipoclorito de sódio, duas o quaternário de amônio, uma a biguanida e uma o ácido peracético. Observando os resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que o sanitizante que continha biguanida foi o mais eficaz contra as bactérias testadas.

PALAVRAS-CHAVE: Sanitizantes, Bactérias patogênicas, Unidades de Alimentação e Nutrição.

1 | INTRODUÇÃO

O ato de se alimentar extrapola o ato de se satisfazer frente à fome. Alimentar-se, como argumenta Evangelista (2002) é levar para o corpo os nutrientes necessários para a sua alimentação. Porém esta missão pode se tornar negativa quando os alimentos também veiculam microrganismos que podem ser nocivos à saúde.

Segundo Franco (2004), as principais fontes de contaminação alimentar são o solo, água, ar, pele dos

animais, manipuladores, equipamentos e utensílios. Nesta perspectiva, a higienização deficiente das superfícies que entram em contato com alimentos permite que os resíduos acumulados transformem-se em fontes de energia para a multiplicação dos micro-organismos. Tal processo pode ocasionar prejuízos, devido à deterioração do produto, até doenças de origem alimentar (NASCIMENTO, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) registra milhares de pessoas que adoecem todos os anos em consequência da ingestão de alimentos contaminados. Percebe-se que o desrespeito aos padrões higiênico-sanitários pode levar a contaminação de qualquer alimento por substâncias tóxicas, microrganismos patogênicos e parasitas.

Sabe-se que as contaminações ocorrem frequentemente no processo de manipulação dos alimentos, seja devido à má higienização do ambiente de preparo e dos utensílios, seja da estocagem inadequada ou ainda da preparação incorreta.

Nesta perspectiva, o controle dos microrganismos é de fundamental importância para evitar a intoxicação alimentar ao ser humano, além de evitar perdas econômicas, como a diminuição da vida de prateleira, recolhimento dos pontos de venda, destruição ou reprocesso (NASCIMENTO, 2010). Assim, a correta higienização de equipamentos e utensílios utilizados no pré-preparo e preparo, cocção e distribuição dos alimentos, bem como a saúde e a higiene do manipulador, evita a proliferação de bactérias e fungos, que podem contaminar os alimentos (MENDES, 2011).

Quanto ao processo de deposição e adesão bacteriana em superfícies de contato, o biofilme, este se inicia quando os microrganismos se agregam aos resíduos constituindo colônias, fornecendo substratos necessários à fixação de outros micro-organismos, permitindo relações simbióticas que aumentam a resistência a agentes químicos e físicos (FERREIRA, 2010).

Para garantir um alimento com qualidade microbiológica satisfatória, são necessários procedimentos adequados de higienização, no qual se incluem duas etapas: limpeza e sanitização. A limpeza tem como objetivo a simples remoção de sujidades orgânicas e inorgânicas, enquanto a sanitização elimina ou reduz os microrganismos, utilizando meios químicos e físicos (SILVA JUNIOR, 2010). Por sua vez, a sanitização química é muito utilizada em restaurantes e indústrias alimentícias. Sua eficiência depende de fatores como concentração do produto, tempo de exposição e ação mecânica.

Diversos são os produtos disponíveis e como exemplos podem-se citar os compostos à base de hipoclorito de sódio, iodo, peróxido de hidrogênio, ácido peracético, quaternário de amônio, biguanida, clorhexidine e desinfetantes fenólicos. Estes são aprovados por órgãos regulamentadores através de testes laboratoriais. Eliminam as formas vegetativas dos microrganismos, mas não necessariamente as esporuladas (NASCIMENTO, 2010).

Para a escolha do sanitizante adequado deve-se avaliar sua eficácia, tempo recomendado de contato, concentração, temperatura, níveis de PH da solução, natureza da superfície, método de aplicação, carga de sujeira orgânica, estabilidade e atividade

residual (FUJYHARA E SYLVIO, 2003). De acordo com Silva Junior (2010), o melhor poder bactericida obtido com a sanitização química para desinfecção ambiental foi com o hipoclorito de sódio na diluição de 200 ppm. Já para desinfecção de equipamentos e utensílios, o hipoclorito de sódio na diluição de 100 a 200 ppm foi o mais eficiente.

Não obstante, para maior entendimento desta pesquisa faz-se necessário a melhor compreensão dos microrganismos. Tal compreensão é também justificada para a escolha de um método de higienização mais eficaz. Nesta perspectiva, o *Staphylococcus aureus* é uma espécie bacteriana Gram-positiva, anaeróbica facultativa, pertencente à família *Micrococcaceae*, que se apresenta sob o agrupamento de cachos de uva. Dentre as espécies de estafilococos, o *S. aureus* é o mais patogênico, podendo causar infecção na pele, olhos, garganta, uretra e trato gastrointestinal (FERREIRA, 2010).

Pseudomonas aeruginosa é um bastonete gram-negativo ubíquo de vida livre, encontrado em ambientes úmidos como água, solo, plantas e detritos. Embora raramente possam causar patologias em indivíduos saudáveis, essas bactérias são uma grande ameaça a pacientes hospitalizados, particularmente aqueles com sérias doenças de base (TORRES, 2006).

Bacillus cereus é uma bactéria ubíqua que pertence à família e se apresenta em forma de bastão, Gram-positiva, aeróbica facultativa, móvel e formadora de esporos esféricos em presença de oxigênio (PAIVA, 2009).

Salmonella é um patógeno pertencente à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos gram-negativos de origem alimentar, mais frequentemente descrito na literatura em ocorrências de toxinfecções em seres humanos (BASSAN. 2008).

Por fim, compreende-se como objetivo deste trabalho avaliar os diferentes sanitizantes: quaternário de amônio, ácido peracético, biguanida e hipoclorito de sódio, quanto ao fator de erradicação de bactérias patogênicas, a fim de ofertar subsídios quanto às variáveis que interferem na atividade antibacteriana dos sanitizantes utilizados frente às bactérias sobreviventes, utilizando como grupo controle o cloro.

2 | DESENVOLVIMENTO

2.1 Tipo de estudo

O estudo realizado foi do tipo experimental, qualitativo, descritivo e prospectivo.

2.2 Local do estudo

O presente estudo foi realizado em junho de 2019. Buscou-se avaliar a ação de diferentes tipos e marcas de sanitizantes sobre bactérias patogênicas, coletando amostras em meios líquidos e utilizando para cada uma das bactérias um caldo específico para o crescimento.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade do

Vale do Sapucaí - UNIVÁS – Campus Fátima, e as linhagens de bactérias utilizadas no estudo foram cedidas pela mesma. Os sanitizantes testados no presente estudo foram doados gentilmente por uma empresa local. Neste trabalho foram utilizados dois métodos: o primeiro avaliou a contaminação bacteriana por *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*, antes e logo após a limpeza de locais selecionados. O segundo método verificou a eficácia de cada sanitizante utilizado em relação às bactérias citadas (FERREIRA, 2009).

2.3 Sanitizantes

Foram testadas seis soluções antimicrobianas sanitizantes, apropriadas para o uso em ambientes e superfícies que entram em contato com os alimentos, a fim de evitar a contaminação (NASCIMENTO, 2010). Todos os sanitizantes possuíam fichas técnicas. Seis soluções sanitizantes foram testadas e todas elas possuíam fichas técnicas, sendo que duas destas tinham em sua composição o hipoclorito de sódio, duas o quaternário de amônio, uma a biguanida e uma o ácido peracético. A escolha por estes produtos teve como base os sanitizantes mais utilizados nas UAN's locais, e as mesmas foram aplicadas nas concentrações recomendadas pelo fabricante.

Quanto a escolha dos sanitizantes, Silva Junior (2010) afirma que, o melhor poder bactericida obtido com a sanitização química para desinfecção ambiental é feita com o hipoclorito de sódio na diluição de 200 ppm. Já para desinfecção de equipamentos e utensílios, o hipoclorito de sódio na diluição de 100 a 200 ppm foi o mais eficiente.

De acordo com Franzin (2005), a biguanida (PHMB) possui uma excelente atividade no controle de microrganismos patogênicos, tais como, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como endoesporos de bactérias termoresistentes (*Bacillus sp.*). O autor destaca também que a biguanida possui um melhor custo benefício comparado a outros sanitizantes, devido à baixa toxicidade em mamíferos, baixa corrosividade de superfícies e formação de espuma.

A biguanida pode ser utilizada em equipamentos, pisos, paredes, sistemas abertos ou CIP (*clean-in-place*), com aplicação manual ou imersão seguida de enxágue em água potável. Ademais, em suas utilizações foram observados resultados positivos utilizando este composto como ingrediente ativo em sanitizantes para indústrias alimentícias quando comparado com outros ativos, conforme evidenciam resultados obtidos em testes realizados com protocolos aceitos pela Comunidade Europeia (FRANZIN, 2005).

Quanto ao mecanismo de ação do princípio ativo da biguanida, Fujihara e Sylvio (2003) defendem que é semelhante ao do quaternário de amônio, com destruição parcial das membranas celulares e alteração dos equilíbrios de transporte metabólico. Na mesma medida, Vicente e Toledo (2003) argumentam que sua ação é praticamente imediata, apresentando baixo potencial de toxicidade, bem como baixa irritabilidade.

A clorhexidina, quando confrontada com as amostras de *Staphylococcus aureus*,

mostrou-se eficiente em todos os tempos testados. Já em outros estudos realizados, os pesquisadores Vicente e Toledo (2003) argumentam também que o *Staphylococcus aureus* apresentou-se sensível ao princípio ativo do sanitizante. Entretanto há controvérsias quando confrontado com os resultados encontrados por Frazier (1972) que relata que os compostos de quaternário de amônio são eficientes frente a todos os microrganismos gram-positivos.

Silva e Jorge (2002) avaliaram a atuação de quatro desinfetantes comumente utilizados em odontologia (álcool, iodo, fenol e clorexidina associada a álcool) em relação ao seu poder de desinfecção de superfícies, avaliando a redução microbiológica em quatro pontos distintos: pia, refletor de luz, encosto de cabeça e carter, concluindo que a clorexidina foi o que teve melhor resultado, principalmente contra bactérias gram-positivas.

Bambace (2003) testou a eficácia de soluções aquosas de clorexidina em cinco diferentes concentrações comparando-as com álcool gel e líquido a 70% frente a bactérias dos gêneros Streptococcus, Staphylococcus, Pseudomonas e Klebsiella e leveduras do gênero Candida em superfícies de couro, fórmica e aço inoxidável, verificando que a clorexidina foi eficiente em ambas às diluições (entre 0,5 e 4%), assim como o álcool.

2.4 Amostras, meios de cultura e reativação das bactérias

Inicialmente foram utilizados tubos de ensaio com meios de cultura específicos (9 ml de cada meio) para reativação de cada uma das quatro bactérias testadas, conforme descreve a tabela 1.1.

Linhagens das cepas bacterianas	Meio de cultura
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 1789	Caldo BHI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	Caldo TSA
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	Caldo TSB
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Caldo BHI + 10% NaCl

Tabela 1.1: Linhagens bacterianas e caldos utilizados na reativação.

Todos os tubos foram autoclavados em autoclave marca Luferco, modelo 39211/nº 13062, a temperatura de 120° C por 20 minutos. Em seguida, após o esfriamento dos meios, foram feitas as reativações de cada uma das quatro cepas em testes de triplicata, utilizando fluxo laminar marca Filtracom, semeando- as 1 ml de cada bactéria em cada tubo nos meios específicos (fotografia 1.1).



Fotografia 1.1 - Caldo para reativação de bactérias.

Fonte: Produção do próprio autor.

Após este procedimento, os tubos foram vedados e levados à estufa marca Fanem Ltda, modelo 002 CB, a 37° C por 24 horas para proliferação das bactérias. Transcorrido o tempo citado, adicionou-se uma rosca de inox (estéril) em cada tubo contendo as bactérias pesquisadas (fotografia 1.2.). Objetivou-se, com tal procedimento, a aderência dos microrganismos e a formação de biofilmes no material de inox. Após este procedimento, os tubos foram vedados e incubados por 24 horas a 37° C.



Fotografia 1.2 – Rosca em inox presente em meio de cultura com crescimento bacteriano.

Fonte: Produção do próprio autor.

Após o período de 24 horas, as roscas de inox, já contaminadas com as cepas de *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *B. Cereus*, foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9 ml de cada sanitizante, simulando assim o processo de higienização. Buscando maior controle para esta investigação, este procedimento foi feito em pares, ou seja, foram utilizados 2 tubos de cada sanitizante para cada bactéria. Destacamos que foram seguidas todas as instruções de diluição e de enxágue recomendadas pelo fabricante, assim como foi seguido o critério com o tempo de exposição de 10 minutos (tabela 1.2).

Sanitizantes	Concentrações	Enxágue
Ácido peracético	0,33 ppm	Não
Biguanida	3,5 ppm	Não
Hipoclorito de sódio 1	2,5 ppm	Sim
Hipoclorito de sódio 2	Não diluir	Sim
Quaternário de Amônio 1	0,5 ppm	Sim
Quaternário de Amônio 2	3,3 ppm	Sim

Tabela 1.2: Sanitizantes testados e modo de ação.

Este processo de transferência da rosca de inox contaminada para o tubo de ensaio contendo o sanitizante representa a etapa que simula o processo de higienização em inox inoxidável, onde para efeitos de comparação utilizamos o hipoclorito de sódio (cloro) como grupo controle.

Testou-se também o sanitizante a base de biguanida (que obteve melhor resultado no teste anterior) e o hipoclorito de sódio 2%, como grupo controle. Foram utilizadas duas placas para cada bactéria, como contraprova. No primeiro poço foi pipetado 20 mcl do composto biguanida, na diluição recomendada pelo fabricante. No poço ao lado, 20 mcl de hipoclorito de sódio, na diluição recomendada pelo fabricante para superfícies que entram em contato com o alimento.

Finalizado esta etapa, os tubos foram levados em estufa à temperatura de 37°C por um período de 24 horas. Após este período foi realizada a leitura observando a turvação do meio. Observou-se que a turvação positiva correspondeu à ineficácia do produto (figura 1.3), já que evidenciou o crescimento das colônias.



Fotografia 1.3 – Crescimento de colônias sugerindo ineficácia dos sanitizantes (tubo contaminado à direita, em comparação com o meio sem inóculo, à esquerda).

Fonte: Produção do próprio autor.

Destacamos ainda que, ao término desta etapa, foram preparados novos meios de cultura e adicionado novamente a rosca em inox que já havia passado pelo processo de higienização (tubos estéreis) como teste de confirmação de resultados, a fim de avaliar a eficácia da sanitização. Ressaltamos também que o tamanho do alo formado entre o poço com o sanitizante e o restante da placa, foi proporcional a eficácia do produto.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Método de turvação dos meios de cultura

A fim de verificar a inibição do crescimento das bactérias, foi observada a turvação e a formação de película na superfície ou precipitado no fundo dos tubos junto aos meios de cultura utilizados. Para efeito de leitura dos resultados, considerou-se bactérias resistentes (R) ao sanitizante quando o meio de cultura apresentava turvação, e bactérias sensíveis (S) ao sanitizante quando não apresentava turvação.

A tabulação dos dados foi feita através de uma tabela comparativa entre sanitizantes e bactérias (Tabela 1.3), utilizando-se dos dados observados.

Sanitizantes	Microrganismos			
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ácido peracético	R	R	R	S
Biguanida	S	S	R	S
Hipoclorito de sódio 1	R	R	S	R
Hipoclorito de sódio 2	R	R	R	S
Quaternário de amônio 1	R	S	R	S
Quaternário de amônio 2	R	S	R	S

Tabela: 1.3: Eficácia dos sanitizantes sobre o crescimento bacteriano.

3.2 Teste de difusão em Agar

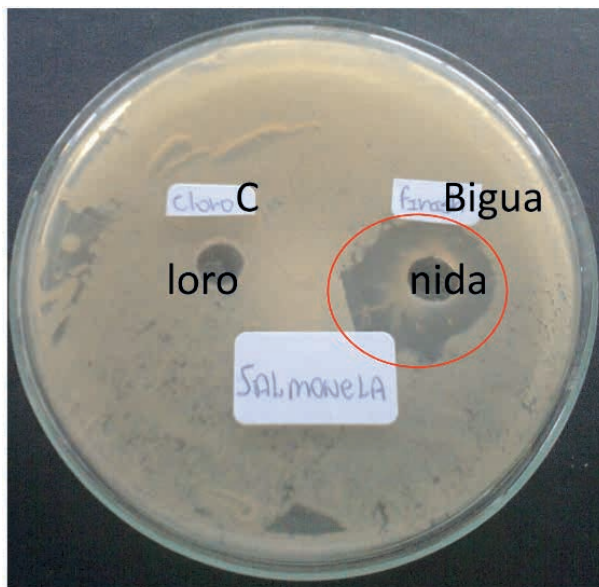
Na última etapa desta pesquisa foi realizado o método de difusão em agar, para confirmação dos resultados obtidos com a turvação dos meios de cultura. A tabela 1.4 ilustra as linhagens das cepas bacterianas com os meios de culturas utilizados para este procedimento.

Linhagens das cepas bacterianas	Meios de cultura utilizados
<i>Bacillus cereus</i>	BHI + Agar (lactose, triptofano, K3PO4, MgSO4 e 2% Agar)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	TSA + 2% Agar
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC10708	TSB + 2% Agar
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC5538	Agar manitol salt

Tabela 1.4.: Meios sólidos utilizados para teste de difusão em Agar.

As placas (fotografia 1.4) e os meios de cultura foram autoclavados, a temperatura de 120° C por 20 minutos. Em seguida, após o esfriamento das placas direcionamos as mesmas para a cabine de fluxo linear, seguindo os padrões de controle para evitar contaminação.

Utilizando uma pipeta automática, marca Brand, foram semeados 500 mcl de cada bactéria em duas placas de cada meio de cultura, e com o auxílio de uma alça de drigalsky foram feitos movimentos de forma circular espalhando o inoculado. Terminado esse procedimento, os meios de cultura dessas placas receberam dois furos para formação de um poço. O primeiro poço contendo hipoclorito de sódio (cloro) como grupo controle e o outro poço contendo o sanitizante Biguanida, a fim de avaliarmos os efeitos e compararmos com o teste anterior. Logo foram incubados a 37° C por 24 horas e no dia seguinte foi realizada a leitura medindo o halo de inibição com o auxílio de um paquímetro.



Fotografia 1.4.: Alo constata eficácia do biguanida sobre a bactéria *Salmonella*.

Fonte: Produção do próprio autor.

Após este procedimento, observou-se uma grande eficácia do sanitizante com princípio ativo Biguanida, conforme Tabela 1.5, sobre as bactérias patogênicas estudadas. Notou-se que todas as bactérias patogênicas analisadas foram inibidas pelo produto. Já o hipoclorito de sódio, amplamente utilizado em indústrias e residências foi eficiente apenas contra a bactéria *Pseudomonas*.

Cepas bactérias patogênicas	<i>S. choleraesuis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
	1,60±0,070	0,85±0,040	0,30±0,001	0,63±0,11

Tabela 1.5: Eficácia do sanitizante Biguanida sobre bactérias patogênicas (desvio padrão).

Por fim, destaca-se que os resultados encontrados neste estudo foram homogêneos, já que em todos os testes realizados, o composto Biguanida se mostrou como o mais eficaz. É importante salientar que foi testado um número reduzido de bactérias patogênicas, se comparado com a ampla quantidade existente.

Percebemos resultados satisfatórios quanto ao uso do sanitizante biguanida (PHMB). O princípio ativo possui um amplo espectro de atuação, aliado a um custo relativamente baixo, além de ter uma desinfecção eficiente, garantindo qualidade e segurança.

Salientamos que o presente trabalho não apresentou diferença estatística significativa, tornando-se necessário destacar que este seria o ponto de partida para pesquisas futuras utilizando os sanitizantes frente aos microrganismos patogênicos, visando à segurança

microbiológica de estabelecimentos produtores de refeição.

REFERÊNCIAS

BAMBACE, A.M.J.; BARROS, E.J.A.; SANTOS, S.S.F.; JORGE, A.O.C.. **Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies**. In. *Rev. Biociência*. Taubaté, v.9, n.2, p.73-81, abr-jun 2003.

BASSAN, J. D. L. **Controle da infecção por *Salmonella Enteritidis* em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo**. In. *Ciência Rural*. Santa Maria, Vol. 38, n.7, p. 1961-1965. 2008. Acesso em: 13 set. 2019.

EVANGELISTA, J. **Alimentos**: um estudo abrangente. São Paulo. Ed. Atheneu, 2002.

FERREIRA, C. A. **Avaliação do efeito antibacteriano sobre desinfetantes utilizados para limpeza do bloco da saúde “s” da universidade do extremo sul catarinense (unesc) Criciúma – SC**. Abril, 2009.

FRANCO, B. D. G. M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo. Ed. Atheneu, 2004. P.2.

FRAZIER, W.C **Microbiologia de los Alimentos**. Tradução de: Food microbiology Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia, 1972.

FUJYHARA, R. M.; SYLVIO, S. B. **Limpeza e Desinfecção de Plantas de Processamento**. In: CONTRERAS, C. J, **Higiene e Sanitização na Indústria de Carnes e Derivados**. São Paulo: Varela, 2003.

FRANZIN, M. **Biguanida Polimérica Versatilidade e Diversificação em um só Produto**. Disponível em http://www.opportuna.com.br/produtos/arquivos/Biguanida_Arch_2008612115838.pdf. Acesso em: 13 set. 2019.

MENDES, R. A., AZEREDO, R. M. C, COELHO, A. I. M. **Contaminação por *Bacillus Cereus* em superfícies de equipamentos e utensílios em unidade de alimentação e nutrição**. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16 (9): 3933-3938, 2011.

NASCIMENTO, H. M., DELGADO, D. A., BARBARIC, I. F. **Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia**. *Revista Ceciliansa*., Jun 2(1): 11-13, 2010.

PAIVA., E. P. et al. ***Bacillus Cereus* e suas toxinas em alimentos**. *Rev. Higiene Alimentar*. Recife, Vol. 23. nº 170/171. Março/abril – 2009.

SILVA, C.R.G; JORGE, A.O.C. **Avaliação de desinfetantes de superfície utilizados em odontologia**. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, São Paulo, v.16, n.2, p.107-114, 2002.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-sanitário em Serviços de Alimentação**. São Paulo. Ed. Varela, 2010. Cap. 4, p. 243.

TORRES, J. C. N. **Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalo-betalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza.** J Bras Patol Med Lab. v. 42 • n. 5 • p. 313-319 • outubro 2006.

VICENTE, E., TOLEDO, M. C. F. **Metodologia para determinação de digluconato de clorhexidina em carcaças de frango utilizando CLAE – par iônico e avaliação de resíduos durante a refrigeração e congelamento.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.23, n. 3, 2003.