



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

HORDÊNIA CHAGAS AZEVEDO GOMES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA EM
SORVETE INOCULADO COM *Listeria innocua***

FORTALEZA

2013

HORDÊNIA CHAGAS AZEVEDO GOMES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA EM
SORVETE INOCULADO COM *Listeria innocua***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Evânia Altina Teixeira de Figueredo

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliane Döering Gasparin Carvalho

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- G612a Gomes, Hordênia Chagas Azevedo.
Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em sorvete inoculado com *Listeria innocua* /
Hordênia Chagas Azevedo Gomes. – 2013.
56 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos,
Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Microbiologia de Alimentos.
Orientação: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Fiqueredo.
Coorientação: Profa. Dra. Juliane Döering Gasparin Carvalho.
1. Sorvete. 2. Quitosana. 3. *Listeria monocytogenes*. I. Título.

HORDÊNIA CHAGAS AZEVEDO GOMES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA EM
SORVETE INOCULADO COM *Listeria innocua***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueredo (Orientadora)
Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFC

Dra. Maria de Fátima Borges
CNPAT/EMBRAPA

Dra. Ana Paula Dionísio
CNPAT/EMBRAPA

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde e força nos momentos que achei não conseguir continuar. Por minha família e meus amigos.

À minha orientadora Prof^a Evânia, pelos conhecimentos repassados, paciência e compreensão.

À bolsista Flayanna, pela presteza, atenção e imensa colação da execução da pesquisa.

À Terezinha Feitoza, pelas contribuições bastante significativas desde a apresentação do projeto e por ser sempre tão prestativa.

Às componentes da banca, Maria de Fátima Borges e Ana Paula Dionísio, pela disponibilidade e contribuições na etapa final.

Ao meu esposo Anastaildo, pelo apoio e compreensão, seja quando estivesse tudo correndo bem ou não.

Aos meus pais, Gervanda e Rufino, por sempre, mesmo nos momentos de dificuldade, terem priorizado minha educação.

Ao meu irmão Hordônio, por sempre torcer e acreditar em mim.

Aos demais familiares, meus avós, padrinhos, tios, primos, sempre presentes.

Aos amigos de trabalho, principalmente Elizângela Nunes, que sem sua compreensão tudo teria sido mais difícil, e ao Paulo e Júnior, com quem sempre pude contar quando precisei me ausentar.

Aos amigos, Vanderson, Mariana, Márcia, Lorena, por ouvirem meus desabafos e me encorajarem...e simplesmente pela amizade.

RESUMO

O consumo de sorvete no Brasil vem crescendo nos últimos anos e paralelo a isso às exigências por parte dos consumidores por alimentos mais seguros e com menos aditivos artificiais também tem aumentado. O sorvete é um alimento nutricionalmente rico, pois tem o leite como um dos seus ingredientes. Porém, esse elevado valor nutricional faz com que o produto seja um meio extremamente favorável ao crescimento de micro-organismos sendo necessária a tomada de medidas de controle visando minimizar possíveis riscos microbiológicos que possam ocorrer por uma contaminação pós-pasteurização. *Listeria monocytogenes* está entre os micro-organismos patogênicos que podem estar presentes em sorvete. Trata-se de uma bactéria amplamente presente na natureza, podendo contaminar o sorvete devido a falhas de higiene ambiental, de manipulador ou através de ingredientes adicionados após pasteurização. Uma das alternativas para controlar o crescimento de micro-organismo em alimentos tem sido o uso da quitosana como antimicrobiano. A presente pesquisa visa avaliar a efetividade da quitosana como antimicrobiano sobre *Listeria innocua* ATCC 3309, em substituição à patogêna *Listeria monocytogenes*, através de testes com meio de cultura pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e adicionada a uma matriz alimentar (sorvete). Para isso, quitosana de alto peso molecular, foi dissolvida em solução de ácido cítrico na proporção 1:1,5. No teste com meio de cultura foram avaliadas as seguintes concentrações: 50, 100, 200, 400 e 800µg/mL; no teste com sorvete, as concentrações avaliadas foram 800, 1200 e 1600µg/mL. A inoculação de *L. innocua* na calda básica para sorvete foi feita na etapa de maturação da calda e o seu crescimento no sorvete foi acompanhado por um período de 60 dias, sendo realizada a contagem desse micro-organismo na calda básica para sorvete logo após a inoculação e decorrido 24 horas de maturação à 5°C. No sorvete, a contagem foi realizada nos tempos 0, 1, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 dias. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) de quitosana sobre *L. innocua* ATCC 330990 foi 800µg/mL. Adicionada ao sorvete, nenhuma das concentrações de quitosana testadas (800, 1200 e 1600µg/mL) reduziram a concentração de *L. innocua* a níveis necessários para considerá-la uma substância antimicrobiana sobre o micro-organismo em questão em um produto com a seguinte composição centesimal: 23,29 à 27,30% de carboidrato, 2,50 à 3,57% de proteína e 4,91 à 6,50% de lipídios.

Palavras-chaves: sorvete, quitosana, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*.

ABSTRACT

The ice cream consumption in Brazil has grown in recent years and, in parallel to the demands by consumers for safer and less artificial additives food has also increased. The ice cream is a nutritionally enriched food, since the milk has as one of its ingredients. However, this high nutritional value makes the product is very favorable to the growth of micro-organisms being necessary means taking control measures to minimize potential microbiological hazards that may occur by a post-pasteurization contamination. *Listeria monocytogenes* is among pathogenic microorganisms that may be present in ice cream. It is a widely present in nature bacteria and contaminate the ice cream because of environmental hygiene, manipulator or through failures ingredients added after pasteurisation. An alternative to controlling the growth of micro-organism in foods has been the use of chitosan as an antimicrobial. This research aims to evaluate the effectiveness of chitosan as an antimicrobial agent against *L. innocua* ATCC 3309, replacing the pathogen *Listeria monocytogenes*, by testing medium by determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and added a food matrix (ice cream). To this end, high molecular weight chitosan was dissolved in a solution of citric acid in the ratio 1:1.5. In the test culture medium with the following concentrations were tested: 50, 100, 200, 400 and 800µg/mL; the test with ice cream, evaluated concentrations were 800, 1200 and 1600µg/mL. The inoculation of *L. innocua* the basic syrup to ice cream was made in the stage of maturation of syrup and ice cream in their growth was followed for a period of 60 days, this microorganism counting was performed in basic syrup to ice cream immediately after inoculation and 24 hours of aging at 5 ° C. elapsed On ice, the count was conducted at 0, 1, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 days. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of *L. innocua* ATCC chitosan on 330990 was 800µg/mL. Added to ice cream, none of the tested concentrations of chitosan (800, 1200 and 1600 µg / ml) reduced the concentration of *L. innocua* at levels necessary to consider it an antimicrobial substance on the micro-organism in question in a product with following chemical composition: 23.29 to 27.30% carbohydrate, 2.50 to 3.57% protein and 4.91 to 6.50% lipids.

Keywords: ice cream, chitosan, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura do sorvete visto por Microscopia de Varredura Eletrônica (SEM).	16
Figura 2 - Estrutura do sorvete visto por Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM).	16
Figura 3 - Equipamento produtor de sorvete: (a) descontínuo, (b) contínuo.	18
Figura 4 - Embalagens para sorvete: (a) caixas descartáveis, (b) potes de polietileno.	19
Figura 5 – Fluxograma geral de produção de sorvete.	19
Figura 6 - Estrutura química da quitosana.	23
Figura 7 - Colônias de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 em TSA+YE.	28
Figura 8 - Fluxograma de elaboração do sorvete e obtenção das amostras.	31
Figura 9 - Etapas do processo de obtenção das amostras.	33
Figura 10 – Efeito da quitosana sobre <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 em meio de cultura. ...	40
Figura 11– Efeito da quitosana sobre <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 em meio de cultura (Concentração Inibitória Mínima – CIM).	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de incorporação de ar (<i>overrun</i>) ao sorvete em relação ao percentual de gordura.	14
Tabela 2 - Teor de gordura em relação ao %ESD na formulação de sorvete.....	15
Tabela 3 - Riscos microbiológicos e medidas de controle na produção de sorvete	21
Tabela 4 - Tratamento e descrição das amostras de sorvete.....	31
Tabela 5 - Contagem de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 em TSB após 6, 12 e 24 horas de incubação a 35°C.....	38
Tabela 6 - Contagem de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 em TSB após 6 horas de incubação a 35°C.....	38
Tabela 7 - Contagem de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 nas respectivas diluições após 6 horas de incubação em TSB a 35°C.	39
Tabela 8 - Contagem de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 inoculada em calda básica para sorvete após 0 e 24 horas de armazenamento a 5°C.	39
Tabela 9 - Contagem de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 na calda básica para sorvete inoculada com 10 ⁷ UFC/mL após 0 e 24 horas de incubação a 35°C.....	40
Tabela 10 – Efeito inibitório de quitosana sobre o crescimento de <i>Listeria innocua</i> (Concentração Bactericida Mínima - CBM).	42
Tabela 11 - Valores de pH de TSB com diferentes concentrações de quitosana.	42
Tabela 12 – Valores de pH e composição centesimal de sorvete com diferentes concentrações de quitosana.	44
Tabela 13 – Efeito da quitosana sobre <i>Listeria innocua</i> em sorvete (experimento 1).....	45
Tabela 14 – Efeito da quitosana sobre <i>Listeria innocua</i> em sorvete (experimento 2).....	45
Tabela 15 - Redução logarítmica de <i>Listeria innocua</i> em sorvete no período de 60 dias.	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 SORVETE.....	12
2.1.1 Definição e Classificação	12
2.1.2 Ingredientes e Composição.....	12
2.1.3 Processo de Fabricação do Sorvete	16
2.1.4 Microbiologia do Sorvete	20
2.1.5 Riscos Microbiológicos na Produção de Sorvete.....	20
2.1.6 Ocorrência de intoxicação alimentar causadas por sorvete	22
2.1.7 <i>Listeria monocytogens</i>	22
2.2 QUITOSANA	23
2.2.1 Propriedades Químicas e Funcionais	23
2.2.2 Atividade antimicrobiana da quitosana	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 MANUTENÇÃO DA CULTURA E PREPARO DO INÓCULO	28
3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANA	29
3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	29
3.4 PRODUÇÃO DO SORVETE E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	30
3.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	33
3.5.1 Pesquisa de <i>Listeria</i> spp.	34
3.5.2 Contagem de <i>Listeria innocua</i>	34
3.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	34
3.6.1 pH.....	34
3.6.2 Umidade.....	35
3.6.3 Cinzas	35
3.6.4 Proteínas	35
3.6.5 Lipídios.....	36
3.6.6 Carboidratos.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO PARA OS TESTES COM MEIO DE CULTURA E NO SORVETE.....	38

4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	40
4.3 EFEITO DA QUITOSANA SOBRE <i>LISTERIA INNOCUA</i> INCORPORADA NA MATRIZ ALIMENTAR (SORVETE)	43
4.3.1 Caracterização físico-química das amostras	43
4.3.2 Pesquisa e contagem de <i>Listeria innocua</i> em sorvete com quitosana	44
5 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A crescente busca dos consumidores por alimentos de boa qualidade, longa vida de prateleira e com reduzido teor de conservantes artificiais faz com que a indústria alimentícia busque alternativas que garantam a inocuidade dos produtos alimentícios quanto à presença de micro-organismos patógenos e suas toxinas (GOULD, 1995).

O uso indiscriminado e rotineiro de conservantes artificiais em alimentos tem favorecido a resistência de alguns micro-organismos. Nesse contexto, pesquisas vêm sendo realizadas visando avaliar o emprego de conservantes naturais em alimentos, dentre eles, a quitosana vem sendo considerada um antimicrobiano natural de potencial aplicação devido sua baixa toxicidade, proporcionando segurança microbiológica e química. Trata-se de um polissacarídeo hidrolisável por enzimas naturalmente presentes no organismo de animais, inclusive do homem, como por exemplo, a lisozima e a quitosanase (MELLO *et al.*, 2006).

A efetividade da quitosana no controle microbiológico de alimentos depende de vários fatores inerentes à própria quitosana, como o peso molecular e o estado físico, à matriz alimentar em que será adicionada, como o pH e a composição do produto, e às características do micro-organismo alvo (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004; KONG *et al.*, 2010; TSAI *et al.*, 2002).

Alimentos à base de leite, como sorvetes, estão envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos mesmo em países onde são realizados controles rigorosos na produção de alimentos, como nos Estados Unidos. Tal fato se deve ao produto apresentar elevado valor nutricional, pH em torno da neutralidade (6,0 a 7,0), favorável ao crescimento microbiano, e ao longo tempo de armazenamento (HONG KONG, 2001). Dentre os micro-organismos envolvidos, podem-se citar os patógenos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., ambos capazes de se multiplicarem sob temperaturas de refrigeração, pondo em risco a saúde de consumidores mais susceptíveis como crianças e gestantes (CATÃO; CEBALLOS, 2001).

O consumo de sorvete no Brasil vem apresentando significativo aumento, atingindo a marca de 76,49% nos últimos dez anos (ABIS, 2013). Essa é uma das razões de se ampliar medidas de controle que garantam a inocuidade do alimento, já que o processo de pasteurização na fabricação de sorvete e o armazenamento à temperatura de congelamento (-18°C) não são suficientes para garantir a segurança do produto, pois pode ocorrer contaminação após a pasteurização caso não sejam adotadas as boas práticas de fabricação.

A busca por parte dos consumidores e da indústria de alimentos por novas

estratégias de conservação de produtos alimentícios aliadas à redução do uso de aditivos artificiais levou pesquisadores a estudar as diversas formas de aplicação da quitosana destinada a este fim, portanto, é significativo o estudo do efeito de antimicrobianos naturais sobre micro-organismos patógenos em sorvete. Assim, este trabalho teve o objetivo de determinar a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima de quitosana sobre *Listeria innocua* em meio de cultura e avaliar o potencial da quitosana como antimicrobiano natural no controle de *Listeria innocua* em sorvete.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SORVETE

2.1.1 Definição e Classificação

A legislação brasileira classifica sorvetes e picolés, como são conhecidos popularmente, em Gelados Comestíveis. Estes são definidos como produtos alimentícios obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem a adição de outros ingredientes ou substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições tais que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante o armazenamento, o transporte e a entrega (BRASIL, 1999).

A legislação brasileira (ANVISA, 1999), classifica os gelados comestíveis de acordo com seus componentes básicos em:

- Sorvete de creme: elaborados basicamente com leite e/ou derivados lácteos e/ou gorduras comestíveis;
- Sorvete de leite: elaborados basicamente com leite e/ou derivados lácteos;
- Sorvete: elaborados basicamente com leite e/ou derivados lácteos e/ou outras matérias primas alimentares, em que os teores de gordura e/ou proteína são total ou parcialmente de origem láctea;
- *Sherbets*: elaborados basicamente com leite e/ou derivados lácteos e/ou matérias primas alimentares e que contém apenas uma pequena porção de gorduras e proteínas as quais podem ser total ou parcialmente de origem não láctea;
- Gelados de frutas ou *Sorbets*: elaborados basicamente com polpas, sucos ou pedaços de frutas e açúcares;
- Gelados: elaborados basicamente com açúcares, podendo ou não conter polpas, sucos, pedaços de frutas e outras matérias primas.

2.1.2 Ingredientes e Composição

A qualidade dos ingredientes e a sua manipulação adequada são fatores importantes na produção de sorvete. Os ingredientes básicos utilizados são: água, gordura, sólidos não gordurosos do leite (SNGL), adoçantes, estabilizantes e emulsificantes, corantes e

aromatizantes, além da opção de adicionar frutas, extrato de malte, cacau, coberturas e outros produtos similares responsáveis por caracterizar o sabor final do sorvete (MOSQUIM, 1999; SOLER; VEIGA, 2001).

A gordura é o ingrediente determinante para o cálculo da mistura, sendo os demais ingredientes estabelecidos com base na proporção em que se ligam à ela (KEENEY; KROGER, 1987; VARNAM; SUTHERLAND, 1994), podendo variar de 0 a 24%, dependendo dos padrões legais, da qualidade e do preço (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996). É o ingrediente responsável pela maciez, cremosidade e pelo desenvolvimento de uma textura suave do produto além de aumentar sua resistência à fusão (AMIOT, 1991; EARLY, 2000; MOSQUIM, 1999). A fonte de gordura mais utilizada é a de origem animal, provenientes do uso de leite integral e de seus derivados como, creme de leite, manteiga, gordura láctea anidra, misturas de leite concentrado. É possível também fazer uso de gordura vegetal hidrogenada própria para gelados comestíveis (ponto de fusão menor que 34°C) quando se quer adicionar mais gordura na formulação a fim de obter um sorvete mais cremoso ou quando o objetivo é a substituição parcial da gordura láctea visando reduzir os teores de colesterol e aumentar plasticidade do produto ou reduzir os custos. Além disso, pode-se também fazer uso de gordura de coco, de palma, de cacau e de algodão. A escolha do tipo de gordura, sua composição e ponto de fusão afetam diretamente as características organolépticas e a estabilidade do sorvete durante seu armazenamento (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003).

Os açúcares adicionados ao sorvete são os responsáveis pela redução do ponto de congelamento e aumento da viscosidade, tornando-o mais cremoso e melhorando a consistência. A sacarose é o açúcar mais utilizado devido seu elevado poder edulcorante (100) quando comparado com outros adoçantes como glicose (74) e lactose (16), além de contribuir para o aumento dos sólidos da mistura que influencia diretamente a textura, cremosidade, maciez e aspecto geral do produto final. A glicose, em pó ou líquida, é uma alternativa de substituição parcial à sacarose por evitar a sensação “enjoativa” e por destacar atributos de cor e sabor no sorvete. Seu uso combinado com a sacarose evita a cristalização desta no produto (MOSQUIM, 1999).

Os emulsificantes são substâncias tensoativas (contêm porção hidrofóbica e hidrofílica na sua molécula), o que possibilita atuar na manutenção da estabilidade da dispersão de duas fases imiscíveis, ou seja, emulsão óleo e água, estabilizando a mistura e facilitando a formação de emulsões e de espuma (ar em suspensão), além de deslocar as proteínas da interface das bolhas de ar (ARMONDES, 1998; COULTATE, 2004; GOFF, 2008; MOSQUIM, 1999; VICENTE; CENZANO; VICENTE, 1996).

Os emulsificantes e os estabilizantes atuam nas propriedades de derretimento do sorvete, facilitam a incorporação de ar e conferem melhor estabilidade durante o armazenamento. A estabilidade ocorre devido à capacidade de retenção de água dos estabilizantes, que imobilizam grande quantidade de água quando dissolvidos, inclusive a água não ligada, provocando o aumento da viscosidade da calda e permitindo uma melhor distribuição do ar. Os estabilizantes também minimizam o crescimento de cristais de gelo quando o sorvete é submetido a variações de temperatura até que seja consumido. Vale ressaltar que os efeitos benéficos de estabilizantes na produção de sorvete só são obtidos quando adicionados nas proporções corretas, não mais que 0,5% (MOSQUIM, 1999). Os estabilizantes mais utilizados são: goma guar, goma xantana, carragenas e alginatos (COULTATE, 2004).

A adição de acidulantes, aromatizantes e corantes na produção de sorvete visa conferir ou acentuar a cor e o sabor característico do produto. Em sorvetes de fruta, a adição de 15% dessa não é suficiente para conferir uma cor atrativa ao sorvete, por isso, recomenda-se a adição de corante. Normalmente, a incorporação de aromas e corantes à calda é realizada antes do seu congelamento, com exceção de materiais sólidos como passas, castanha e nozes, que são adicionados no produto já congelado, no momento da saída do equipamento produtor (MOSQUIM, 1999).

Overrun é o nome dado ao aumento de volume obtido pelo batimento de ar na mistura durante o processo de congelamento do sorvete (HONG KONG, 2001). Esse processo também é chamado de incorporação de ar. O percentual de *overrun* adicionado varia, principalmente, com o equipamento utilizado e com o balanceamento dos ingredientes adicionados à calda afetando diretamente o cálculo de custos do sorvete (VARNAM; SUTHERLAND, 1994). Se o sorvete tem 100% de *overrun*, significa que o volume de ar é igual ao volume da mistura, ou seja, 1 litro de mistura faz 2 litros de sorvete (HONG KONG, 2001). Mosquim (1999) relaciona o percentual de gordura do sorvete com o percentual de *overrun* a ser adicionado (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentual de incorporação de ar (*overrun*) ao sorvete em relação ao percentual de gordura.

% GORDURA	% <i>Overrun</i>
10	110 a 112
10 a 12	80 a 105
10 a 14	40 a 90

Fonte: MOSQUIM, 1999 (adaptado).

A fórmula para o cálculo do percentual de *overrun* adicionado é a seguinte:

$$\text{Overrun} = \frac{\text{VF} - \text{VI}}{\text{VI}} \times 100$$

Onde: VF = volume final e VI = volume inicial

Marshall, Goff e Hartel (2003) relatam que além da qualidade dos ingredientes utilizados, a obtenção de um sorvete com as características desejáveis depende também da correta proporção dos ingredientes. A formulação da calda básica de sorvete é feita a partir de um balanceamento dos ingredientes, com ênfase nos percentuais de gordura, sólidos não gordurosos do leite (SNGL) ou extrato seco desengordurado (ESD), açúcar e sólidos totais (ST) ou extrato seco total (EST). À medida que o teor de gordura aumenta, é necessário reduzir o teor de ESD (Tabela 2). Essa relação é importante para a obtenção de um sorvete de qualidade e para evitar a cristalização da lactose (MOSQUIM, 1999).

Tabela 2 - Teor de gordura em relação ao %ESD na formulação de sorvete.

% GORDURA	% ESD*
10	11,0-12,0
12	10,5-11,0
14	8,5-10,5
16	7,0-9,5
18	6,5-8,5
20	6,0-7,5

Fonte: MOSQUIM, 1999.

*ESD: Extrato seco desengordurado.

A porção de sólidos não gordurosos do leite (SNGL) é formada por lactose, proteínas, sais minerais e vitaminas hidrossolúveis. Esses componentes contribuem para as características de corpo, textura e sabor do produto, além de tornarem o sorvete um alimento altamente nutritivo decorrente do elevado valor biológico das proteínas presente (caseínas, albuminas e globulinas). O excesso de SNGL ou ESD pode provocar a cristalização da lactose e a sua falta forma um produto sem coesão e com pouco *overrun* (MOSQUIM, 1999).

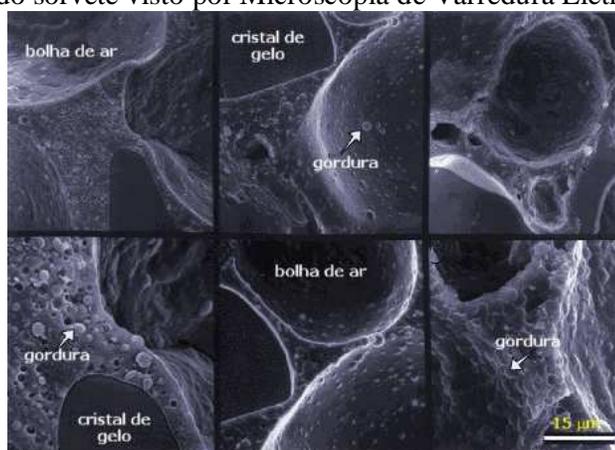
A composição química do sorvete determina vários parâmetros estruturais e sensoriais importantes para a obtenção de um produto final de qualidade, como firmeza, resistência ao derretimento e textura (GRANGER *et al.*, 2005).

2.1.3 Processo de Fabricação do Sorvete

O sorvete é fabricado a partir de uma mistura básica, também chamada de calda ou emulsão estabilizada, pasteurizada e submetida ao processo de congelamento sob agitação (batimento) e incorporação de ar (*overrun*), produzindo uma substância cremosa que atenda aos padrões definidos para sólidos totais e *overrun* (MOSQUIM, 1999).

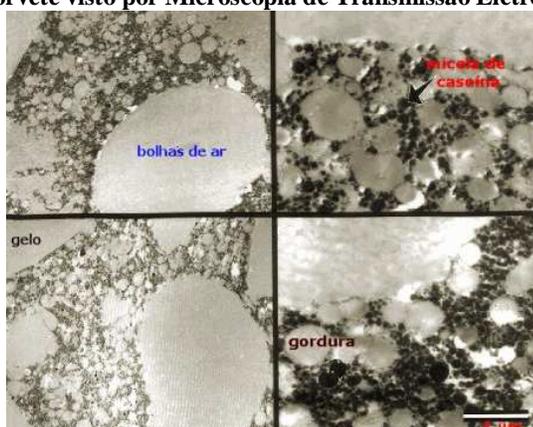
Para Pereda *et al.* (2005), trata-se de uma espuma congelada na qual as bolhas de ar estão cobertas por cristais de gelo, cristais de lactose e glóbulos de gordura individualizados ou parcialmente fundidos, em que a união desses glóbulos de gordura com as bolhas de ar conferem firmeza ao sorvete. A estrutura do sorvete é apresentada nas Figuras 1 e 2.

Figura 1- Estrutura do sorvete visto por Microscopia de Varredura Eletrônica (SEM).



Fonte: GOFF; VERESPEJ; SMITH (1999).

Figura 2 - Estrutura do sorvete visto por Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM).



Fonte: GOFF; VERESPEJ; SMITH (1999).

Na Figura 1 é possível observar bolhas de ar, glóbulos de gordura e cristais de gelo dispersos na solução de açúcar e na Figura 2, obtida por uma técnica mais eficiente, é possível visualizar até as micelas de caseína, localizadas próximas aos glóbulos de gordura.

O processo de fabricação de sorvete é variável de acordo com o processo tecnológico e com os equipamentos utilizados, tendo as seguintes etapas básicas: preparo dos ingredientes, homogeneização, pasteurização, resfriamento rápido, maturação, congelamento por batimento, acondicionamento, congelamento final (GOFF, 2008).

Os ingredientes são pesados e adicionados em taques misturadores dotados de hélice e sistema de aquecimento ou no próprio pasteurizador. Inicialmente são colocados os ingredientes líquidos, água ou leite *in natura*, e em seguida os ingredientes sólidos como leite em pó, açúcares, gordura, espessantes, estabilizantes e saborizantes e a mistura é aquecida à medida que os ingredientes são adicionados. Recomenda-se dispersar os estabilizantes em açúcar ou outro ingrediente sólido antes de adicioná-los à mistura (SOLER; VEIGA, 2001).

A homogeneização pode ser feita antes da pasteurização ou paralelamente a ela, no caso de o pasteurizador dispor de homogeneizador, sendo fundamental o pré-aquecimento da mistura. Esta etapa consiste na quebra ou redução do tamanho dos glóbulos de gordura para impedir sua separação nas etapas posteriores como maturação e congelamento. Um sorvete homogeneizado torna-se mais uniforme, possibilita reduzir o tempo de maturação e requer menos espessante (MOSQUIM, 1999).

A pasteurização é uma etapa obrigatória na fabricação de gelados comestíveis elaborados com produtos de laticínios e/ou ovos, de acordo com a legislação (BRASIL, 1999), que também cita a relação tempo x temperatura a ser aplicada, sendo maior que o binômio utilizado para pasteurizar leite fluído, pois a adição de açúcar e gordura como ingredientes do sorvete dificulta a transferência de calor. Nesse caso, recomenda-se utilizar 70°C por 30 minutos para processo em batelada ou 80°C por 25 segundos para processos contínuos (BRASIL, 1999; VARNAM; SUTHERLAND, 1994). O tratamento térmico aplicado tem como principal objetivo destruir os micro-organismos patogênicos para atender os padrões legais, além de aumentar o período de conservação do produto. Além disso, promove uma melhor distribuição dos ingredientes e faz com que os estabilizantes e emulsificantes se dissolvam completamente e trabalhe com toda sua potencialidade (MOSQUIM, 1999).

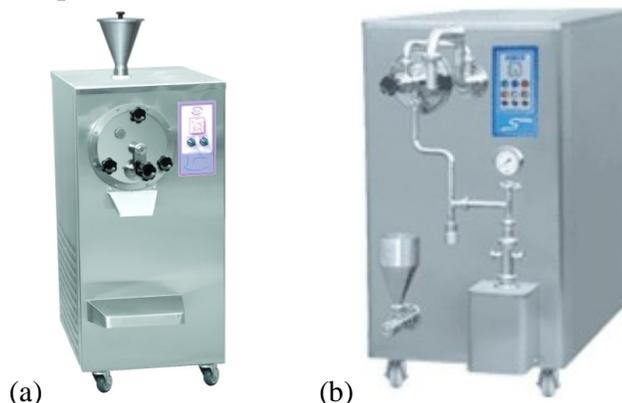
A calda pasteurizada deve ser resfriada rapidamente a temperaturas de 7 a 10°C para evitar a multiplicação de micro-organismos não-patógenos sobreviventes ao tratamento térmico (MOSQUIM, 1999). Em seguida, a calda é transferida para tinas de maturação, onde atingirá temperaturas mais baixas (3-5°C), sob agitação lenta e constante, por um tempo que

pode variar de 1 a 24 horas, sendo maior o tempo para sorvetes com maior teor de gordura e evitado períodos muito longos para que não ocorram alterações por micro-organismos psicrótróficos (VARNAM; SUTHERLAND, 1994). Essa etapa contribui para o aumento da viscosidade da calda devido à hidratação das proteínas e dos estabilizantes, que absorvem água livre, favorece a absorção de ar durante o batimento e aumenta a resistência ao derretimento do sorvete (AMIOT, 1991; EARLY, 2000; MADRID; CENZANO VICENTE, 1996; MOSQUIM, 1999).

A etapa de congelamento é realizada em duas partes. Na primeira, a mistura é congelada sob contínua agitação (batimento) e na segunda ocorre o endurecimento do sorvete em câmaras de armazenamento. Durante o congelamento sob agitação ocorre a incorporação de ar, em que aproximadamente 33 a 67% da água são congeladas e o produto adquire uma consistência semi-sólida, saindo do equipamento produtor a uma temperatura de aproximadamente -6°C . O restante da água é congelada quando o produto é estocado em câmaras de congelamento à temperaturas de aproximadamente -25°C (MOSQUIM, 1999).

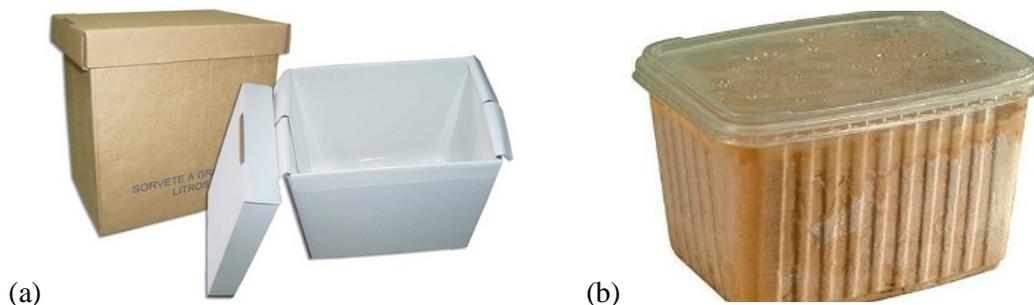
O processo de congelamento pode ocorrer em dois tipos de equipamentos: congeladores descontínuos (Figura 3a), utilizados para processo artesanal ou em baixa escala ou congeladores contínuos (Figura 3b), utilizados para fabricação em escala industrial. Este último processo é mais rápido, congela cerca de 50% da água em poucos minutos, forma grandes quantidades de pequenos cristais de gelo e o produto adquire corpo e textura suaves. Além disso, esse equipamento é dotado de um dosador de ar permitindo que sorvete obtenha um *overrun* de até 130%, enquanto no equipamento descontínuo o ar é incorporado apenas por agitação da calda à pressão atmosférica, atingindo um *overrun* de 50 a 100% (MOSQUIM, 1999; VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

Figura 3 - Equipamento produtor de sorvete: (a) descontínuo, (b) contínuo.



O produto pode ser envasado em embalagens de diferentes volumes conforme o destino da venda; se fracionada, utiliza-se caixas descartáveis (Figura 4a) ou em pontos de venda em que o consumidor leva o produto embalado para casa. Nesse último caso, normalmente são utilizadas embalagens rígidas (Figura 4b), como potes termoformatados de polietileno de baixa densidade (SOLER; VEIGA, 2001).

Figura 4 - Embalagens para sorvete: (a) caixas descartáveis, (b) potes de polietileno.



Fonte: www.ibiubi.com.br (2013).

O congelamento final ocorre em câmaras de armazenamento ou em freezers com temperatura entre -25° e -30°C , onde o teor de água congelada atinge 80 a 90%. O endurecimento rápido do sorvete é fundamental para evitar a formação de grandes cristais de gelo que possam prejudicar a textura do produto (AMIOT, 1991; SOLER; VEIGA, 2001).

O fluxograma geral de fabricação de sorvete é apresentado na Figura 5.

Figura 5 – Fluxograma geral de produção de sorvete.



Fonte: MOSQUIM, 1999.

2.1.4 Microbiologia do Sorvete

A microbiota da mistura básica para sorvete antes do tratamento térmico está relacionada à qualidade microbiológica dos ingredientes (ICMSF, 1991). Os ingredientes utilizados associados ao processo de fabricação podem tornar os gelados comestíveis um alimentos de alto risco epidemiológico (MILIKITA; CÂNDIDO, 2004).

A legislação brasileira estabelece os seguintes padrões microbiológicos para gelados comestíveis: ausência de *Salmonella* sp/25g; valores máximos de 10^2 UFC/g de Estafilococos coagulase positiva, de 10 UFC/g de coliformes termotolerantes e não estabelece padrão de referência para *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 2001).

Contagens de Estafilococos coagulase positiva e de coliformes termotolerantes superiores aos estabelecidos pela legislação indica deficiência no aspecto higiênico-sanitário e é um indicativo de contaminação fecal no caso do coliforme; e a presença de *Salmonella* indica possíveis falhas no processamento ou a ocorrência de condições que permitam a sua proliferação no alimento (SOLER; VEIGA, 2001).

2.1.5 Riscos Microbiológicos na Produção de Sorvete

O fato do leite ser um dos ingredientes utilizados na fabricação de sorvete elevar o seu valor nutricional, o pH do meio encontrar-se na faixa de neutralidade (6-7) e o longo período de armazenamento do produto faz com que o sorvete necessite de mecanismos de controle para evitar o crescimento microbiano (BELL; KYRIAKIDES, 1998).

A pasteurização é um mecanismo eficaz para eliminar micro-organismos patogênicos inclusive *Listeria monocytogenes* em sorvete, pois essa bactéria é rapidamente inativada em temperaturas acima de 70°C, apresentando um valor D^1 de 10 segundos para a temperatura de 70°C, 5 a 10 minutos para 60°C e de algumas horas para 50°C (LAKE; CRESSEY; HUDSON, 2009).

A contaminação do sorvete com *L. monocytogenes* após a pasteurização pode ser proveniente dos ingredientes adicionados, do manipulador e de contaminação ambiental. Ocorrendo a contaminação, principalmente nas etapas de maturação e adição de ingredientes, é provável que *L. monocytogenes* sobreviva às condições de congelamento em que o produto é armazenado (LAKE; CRESSEY; HUDSON, 2009). Gougouli, Angelidis e Koutsoumanis

¹ Valor D: é o tempo necessário para destruir 90% dos micro-organismo.

(2008) confirmaram o potencial de crescimento de *Listeria* spp. em sorvete no caso de uma contaminação pós-pasteurização. A Tabela 3 mostra os possíveis riscos microbiológicos associados às diferentes etapas de processamento de sorvete.

Tabela 3 - Riscos microbiológicos e medidas de controle na produção de sorvete

PROCESSO	RISCOS	MEDIDAS DE CONTROLE
Matéria-prima	Presença de patógenos	Seleção de fornecedor
Pasteurização	Sobrevivência de patógenos	Controle tempo x temp. Manutenção do equipamento Desinfecção eficaz do equipamento
Maturação	Recontaminação Crescimento de micro-organismos	Desinfecção do equipamento e de utensílios T < 5°C
Envase	Recontaminação	Higiene ambiental, de equipamentos e utensílios
Adição de ingredientes	Recontaminação	Higiene ambiental da área de armazenamento, de equipamentos e utensílios Práticas higiênicas
Congelamento	Recontaminação	Limpeza e desinfecção de equipamentos e utensílios
Armazenamento e Transporte	Crescimento de micro-organismos	T < -18°C Descarte de produtos descongelados

Fonte: ICMSF (1998).

Dentro do contexto de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), o sorvete pode ser considerado um produto de baixo risco de contaminação visto que as bactérias não crescem nas temperaturas de congelamento em que o produto é armazenado (LAKE; CRESSEY; HUDSON, 2009). Em contrapartida, um estudo realizado por Dairy Food Safety Victoria - Austrália - (DAIRY FOOD SAFETY VICTORIA, 2001) concluiu que o sorvete é um produto de alto risco, levando em consideração não somente a presença de *L. monocytogenes*, mas outros fatores tais como:

- Sorvete ser o produto responsável pela maioria de recalls devido à presença de *L. monocytogenes* do que outros produtos lácteos não fermentados;
- A quantidade de *Salmonella* spp. necessária para provocar uma doença transmitida por alimentos pela ingestão de sorvete ser substancialmente menor quando comparada a outros produtos;
- Alguns patógenos podem sobreviver em sorvete durante anos;
- Sorvetes têm provocado surtos por doenças transmitidas por alimentos.

2.1.6 Ocorrência de intoxicação alimentar causadas por sorvete

Os principais micro-organismos que provocam surtos de intoxicação alimentar pela ingestão de sorvete são: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, além de *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus* spp., sendo esses últimos capazes de sobreviver no alimento a baixas temperaturas (CASARTELLI, 1996; HAJDENWURCEL, 2002; HONG KONG, 2001; VAN DER JAGT, 1994). Segundo Gallardo *et al.* (2000), surtos envolvendo sorvete estão relacionados à contaminação do produto por leite *in natura*, ovos crus e por manipulação inadequada.

Warke *et al.* (2000) analisaram 30 amostras de sorvete comercializados em Mumbai e Índia, e constataram a presença de *L. monocytogenes* em 100% das amostras a granel e 53% das amostras embaladas.

Na Bélgica, um homem de 62 anos de idade, imunocomprometido desenvolveu meningite após consumir sorvete contaminado com *L. monocytogenes*. No entanto, suspeita-se que a fonte mais provável da contaminação tenha sido de um “creme fraiche” (cobertura aplicada ao sorvete), pois o teor de gordura do recipiente foi maior que o do produto não aberto (ANDRE *et al.*, 1990; RYSER, 1999).

2.1.7 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um bacilo Gram positivo, anaeróbio facultativo e mesmo não sendo formador de esporo, apresenta elevada resistência ao congelamento, desidratação, acidez e calor (SATAKE *et al.*, 2003), conseguindo se desenvolver em temperaturas de -1,5 a 45°C, embora sua faixa ótima seja de 30 a 37°C, em pH de 4,4 a 9,4 (ótimo de 7) e em concentrações não superiores a 10% de NaCl (DOYLE; BEUCHAT; MONTVILLE, 2001).

É uma bactéria comumente encontrada no solo, silagem, plantas e decomposição (SATAKE *et al.*, 2003) e já foi isolada a partir de uma ampla gama de alimentos processados, como patês, leite, queijos, sorvetes, produtos prontos para consumo, carnes, produtos de peixe defumado e levemente processado. Sua característica psicrótrfica aliada à capacidade de sobreviver bem em alimentos congelados são as razões pelas quais é considerada um risco em alimentos refrigerados de longa vida de prateleira e em plantas de processamento em que o frio é aplicado como medida de controle microbiano (CURTIS, 2007).

Benkerroum *et al.* (2005) consideram bactérias do gênero *Listeria* uma ameaça à indústria de alimentos devido sua capacidade de se multiplicar em plantas de processamento

de alimentos. Essa característica se deve principalmente ao crescimento de biofilmes² na superfície de equipamentos processadores, protegendo-as da ação de sanitizantes (MORETRO; LANGSRUD, 2004).

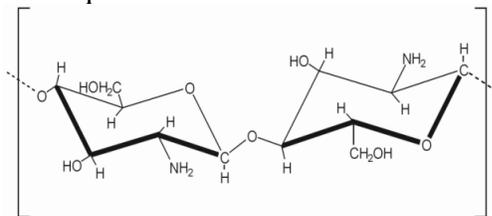
A infecção causada por *L. monocytogenes* é chamada de listeriose e pode ser invasiva e não-invasiva. O primeiro caso ocorre principalmente como resultado de uma transmissão placentária do organismo para o feto após a infecção da mãe, que apresenta como sintoma apenas uma ligeira febre, mas que pode levar o feto à morte. Já a não-invasiva é normalmente chamada de gastroenterite febril, ou seja, gastroenterite associada à sintomas semelhantes aos de uma gripe “leve”, como diarreia, febre, dores musculares e dor de cabeça. O período de incubação da listeriose não-invasiva é de 11 horas à 7 dias e alguns dados relatam que a dose de ingestão necessária para a infecção se manifestar deve ser maior que 10^6 - 10^7 UFC/mL ou UFC/g (LAKE; CRESSEY; HUDSON, 2009).

2.2 QUITOSANA

2.2.1 Propriedades Químicas e Funcionais

A quitosana é um polissacarídeo derivado da desacetilação da quitina [poli-β-(1→4)-N-acetil-D-glucosamina] que é um biopolímero linear presente no exoesqueleto de crustáceos e moluscos e na parede celular de fungos e insetos. É conhecida como o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose (AVILA *et al.* 2010). Sua estrutura química é apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Estrutura química da quitosana.



Fonte: Tharanathan e Kittur (2003).

As propriedades funcionais da quitosana variam de acordo com os seus diferentes

² É uma massa celular aderida à uma superfície, envolvida por uma camada de partículas de matéria orgânica, formando depósitos, nos quais os micro-organismos estão fortemente tornando-os mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como aqueles usados em procedimentos de higienização (CRIADO; SUÁREZ; FERRERÓS, 1994; LECLERCQ-PERLAT; LALANDE, 1994).

graus de desacetilação e pesos moleculares, podendo também ser influenciadas pela fonte de obtenção e pelo método de preparo (NO *et al.*, 2007). A quitosana é insolúvel em água ou qualquer meio que apresente um pH maior que 6,0, e solúvel em soluções de ácido orgânico fraco, embora alguns de seus derivados na forma de acetato, ascorbato e lactato sejam solúveis em água (JEON; SHAHIDI; KIM, 2000). Alguns dos ácidos utilizados para dissolver a quitosana são: ácido cítrico (CAMPANIELLO *et al.*, 2008), ácido láctico (BEVERLYA *et al.*, 2008; JIANG, 2011) e ácido acético (PONCE *et al.*, 2008; YE; NEETOO; CHEN, 2008).

A quitosana tem sido bastante empregada na indústria de alimentos devido sua biocompatibilidade, atoxicidade, biofuncionalidade e sua capacidade de formação de géis, filmes e coberturas comestíveis (JIANG; NEETOO; CHEN, 2011), desacidificação e clarificação de sucos (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999), para fins dietéticos, como emulsionante e conservante (DUTTA, P.; DUTTA, J.; TRIPATHI, 2004).

O uso da quitosana como aditivo alimentar é permitido na Coreia desde 1995 e no Japão desde 1983 (WEINER, 1992; KFDA, 1995). Nos Estados Unidos, o Food Drug Administration (FDA) admitiu em 2005, o uso da quitosana derivada de camarão como um aditivo GRAS para uso em procedimentos científicos em alimentos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2005).

2.2.2 Atividade antimicrobiana da quitosana

A quitina e a quitosana vêm sendo estudadas devido seu potencial de preservação de alimentos, exercendo atividade antimicrobiana sobre uma ampla gama de micro-organismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias (SAGOO; BOARD; ROLLER, 2002). Embora o mecanismo de ação da quitosana sobre os micro-organismos ainda não esteja bem elucidado, a hipótese mais viável se deve à mudança de permeabilidade da célula devido a interações entre a molécula da quitosana, carregada positivamente, e a membrana das células microbianas, carregadas negativamente, provocando o vazamento de proteínas e outros constituintes intracelulares (FANG; LI; SHIH, 1994; LEUBA; STOSSEF, 1986; PAPINEAU *et al.*, 1991; SUDARSHAN; HOOVER; KNORR, 1992; YOUNG; KOHLE; KAUSS, 1982).

O efeito antimicrobiano da quitosana depende de vários fatores, que podem ser divididos em quatro categorias: (1) fatores microbianos, que envolvem a espécie de micro-organismos e a célula alvo; (2) fatores intrínsecos da quitosana, incluindo grau de desacetilação, densidade de carga positiva, peso molecular, características hidrofílica e/ou

hidrofóbica e capacidade quelante; (3) estado físico da quitosana; (4) fatores ambientais, como força iônica do meio, pH e temperatura (KONG *et al*, 2010; TSAI *et al*, 2002). Além disso, os diferentes componentes presentes no alimento, como, carboidratos, proteínas, gordura, minerais e vitaminas podem interagir com a quitosana provocando a perda ou melhorando sua atividade antimicrobiana (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004).

A eficiência inibitória da quitosana sobre os micro-organismos é bastante variável (HERNANDEZ-LUZARDO *et al*, 2008). Há estudos que relatam que a atividade antibacteriana é maior em bactérias gram-negativas do que em gram-positivas (CHUNG *et al.*, 2004; NO *et al.*, 2002); outros apontam as bactérias gram-positivas como sendo mais susceptíveis (ZHONG *et al.*, 2008); ainda há aqueles que não observaram diferenças significativas do efeito antimicrobiano sobre as bactérias (WANG; DU; LIU, 2004). Tal fato pode ser influenciado pelo tempo de cultivo da célula analisada; sugere-se que a carga negativa da superfície da célula bacteriana varia de acordo com a sua fase de crescimento, levando a diferenças de susceptibilidade das células ao efeito da quitosana (TSAI; SU, 1999).

A carga positiva da quitosana está associada ao grau de substituição da quitosana por seus derivados na forma de acetato, ascorbato ou lactato, interferindo no efeito antimicrobiano; quanto maior for a densidade de carga positiva da quitosana, maior a interação eletrostática com a célula microbiana (KONG *et al*, 2010) . Segundo Kong *et al.*, (2008b), quitosana de alta densidade de carga positiva (97,5%) confere atividade antibacteriana mais forte que de média densidade de carga positiva (83,7%) sobre *S. aureus* em pH 5,5.

A presença de água é necessária para que os agentes antimicrobianos exerçam sua atividade, visto que amostras secas são incapazes de liberar a energia armazenada nas ligações químicas para iniciar a interação. As características de hidrofiliicidade e hidrofobicidade estão relacionadas ao ambiente de água onde quitosana desempenhará sua atividade antimicrobiana, o que limita seu uso devido sua baixa solubilidade em água (DUTTA, P.; DUTTA, J.; TRIPATHI, 2004). A elevada capacidade quelante da quitosana a íons metálicos como Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} e Cu^{2+} em meio ácido (KURITA, 1998), auxilia sua atividade como agente antimicrobiano através da desestabilização da parede celular microbiana, já que esta estabilidade é mantida devido à combinação entre íons metálicos e moléculas presentes na parede celular (RABEA *et al.*, 2003).

As reações que envolvem a atividade antimicrobiana ocorrem entre a molécula de quitosana e a parede celular, por isso a morfologia da célula e o estado físico da quitosana são

fatores que interferem na sua eficiência. Quitosanas solúveis em água e seus derivados (quitosana e maltose, glicose, frutose, glucosamina) são mais eficientes na inibição do crescimento bacteriano, por apresentarem maior solubilidade, sendo a quitosana-glucosamina a mais eficaz como agente bactericida natural. Estudos mostram que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de derivados de quitosana é significativamente menor sobre várias bactérias do que a quitosana nativa (CHUNG *et al.*, 2004; XIE; XU; LIU, 2001).

O pH é um fator importante no desempenho da atividade antimicrobiana pela quitosana e por seus derivados. O efeito inibitório da quitosana é maior em pH baixo (menor que 7), sendo enfraquecido a medida que o pH vai aumentando, o que se deve, provavelmente, à grande presença de grupos amino sem carga positiva em pH 7, além da sua baixa solubilidade nessa faixa de pH (AIEDEH; TAHA, 2001; HELANDER *et al.*, 2001; KONG *et al.*, 2008b; PAPINEAU *et al.*, 1991; SUDARSHAN; HOOVER; KNORR, 1992). A eficiência antibacteriana da quitosana sob condições neutras de pH é relatada em algumas pesquisas (KONG *et al.*, 2008b). Em outros estudos, verificou-se aumento da atividade antibacteriana de derivados de quitosana N-aquiladas (grau de substituição DS 30-40%) sobre *E. coli* a medida que o pH aumentou, até atingir um máximo em pH de 7,0-7,5 (YANG; CHOU; LI, 2005). Esses resultados indicam que a carga positiva dos grupos aminos não é o único fator interferente na atividade antibacteriana da quitosana; o fato é que ainda não se constatou o efeito antimicrobiano em condições alcalinas (KONG *et al.*, 2010).

Alterações na força iônica do meio podem inibir a atividade antibacteriana da quitosana (CHUNG *et al.*, 2003; RAAFAT; SAHL, 2009) de duas maneiras: o aumento de íons metálicos divalentes, como Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} interferem na eficiência da capacidade quelante da quitosana, sendo o Zn^{2+} o que apresenta maior efeito inibitório; e/ou cátions presentes no meio competem com os componentes negativos e dominam a parede celular da bactéria reduzindo a atividade antimicrobiana (CHUNG *et al.*, 2003; KONG *et al.*, 2008a; TSAI; SU, 1999; XING *et al.*, 2009).

As condições de temperatura e o tempo que soluções de quitosana são submetidas quando armazenadas podem alterar a viscosidade de soluções de quitosana e conseqüentemente influenciar nas suas propriedades funcionais. No *et al.* (2006) investigaram a estabilidade da atividade antibacteriana de uma solução de quitosana sobre bactérias gram-positivas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) e gram-negativas (*Salmonella enteritidis* e *E. coli*) a 4 e a 25°C após 15 semanas e constataram que o armazenamento a 25°C apresentou o mesmo efeito ou efeito reduzido quando comparada a solução armazenada a 4°C após 15 semanas, ocorrendo também uma redução do efeito ao longo do tempo. Em relação ao micro-

organismo, Tsai e Su (1999), verificaram maior susceptibilidade da *E. coli* sobre o efeito da quitosana com o aumento da temperatura de 4 para 37°C, sugerindo que baixas temperaturas alteram a estrutura celular da bactéria, reduzindo os sítios de ligação da quitosana na superfície.

Vale ressaltar que a eficiência antimicrobiana da quitosana quando analisada *in vitro* não é a mesma observada quando esta é aplicada em alimentos. O fato se deve à interações entre a quitosana e os componentes químicos e nutricionais do alimento resultando em efeito antimicrobiano moderado ou até nenhum efeito conservante. Essa possível interação e as mudanças nas características sensoriais do produto devem ser consideradas ao fazer uso da quitosana ou de qualquer outro agente antimicrobiano em alimentos (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004; DUTTA *et al.*, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.1 MANUTENÇÃO DA CULTURA E PREPARO DO INÓCULO

Utilizou-se cepa de *Listeria innocua* (ATCC 33090), marca Microbiologics, em substituição ao patógeno *Listeria monocytogenes* (SCOTT *et al.*, 2005). A cepa liofilizada de *L. innocua* ATCC 33090 foi ativada conforme recomendação do fabricante e em seguida a bactéria foi cultivada em Ágar Trypticase de Soja (TSA/Difco) suplementado com 0,6% de Extrato de Levedura a 35°C por 24 horas. A partir desse cultivo, uma massa celular foi retirada e estriada por esgotamento em placas com TSA suplementado para obter colônias isoladas de *L. innocua* (Figura 7). Após 24h de incubação a 35°C, identificou-se colônias de tamanho padronizado em 1mm e com o auxílio de uma alça, transferiu-se uma colônia isolada para tubo de ensaio com 5mL de caldo Trypticase de Soja (TSB/Difco) e incubou-se a 35°C por 6, 12 e 24 horas para o crescimento da bactéria. Foram testados três tempos diferentes para definir um desses como sendo o tempo de incubação de *L. innocua* em TSB durante todo o experimento, com base nas concentrações encontradas em cada um deles. A cada tempo, foi transferido 1mL da cultura em TSB para 9mL de Água Peptonada 0,1% (Difco), obtendo-se a diluição 10^{-1} e assim sucessivamente até a diluição 10^{-7} . Plaqueou-se, em duplicata, 0,1mL (100 μ L) de cada diluição em Ágar Oxford (OXA/OXOID) para contagem de *L. innocua* e as placas foram incubadas a 35°C por 24h. Em seguida foi feita a contagem de colônias da bactéria considerando a diluição que apresentasse entre 25 e 250 colônias por placa. As concentrações do inóculo foram ajustadas para 10^5 UFC/mL, que é a concentração recomendada para avaliar o efeito de um agente antimicrobiano (SCOTT *et al.*, 2005).

Figura 7 - Colônias de *Listeria innocua* ATCC 33090 em TSA+YE.



Fonte: Autora (2013).

Esse procedimento foi realizado para padronização das concentrações a serem inoculadas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) e para a incorporação de *L. innocua* na matriz alimentar (sorvete).

3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANA

A quitosana foi adquirida da empresa POLYMAR Indústria e Comércio de Importação e Exportação LTDA, com grau de desacetilação de 95,1% e alta massa molecular, pois pesquisas demonstram que a atividade antimicrobiana da quitosana sobre bactérias gram-positivas aumenta quanto maior for sua massa molecular (FAI, 2008; ZHENG; ZHU, 2003).

A solução de quitosana foi obtida através da sua dissolução em solução ácida preparada com água destilada e ácido cítrico para fins alimentícios, escolhido por ser um ingrediente comumente utilizado na formulação de sorvete como realçador de sabor. Inicialmente, adicionou-se o ácido cítrico à água destilada obtendo-se uma solução ácida e em seguida, adicionou-se gradativamente a quitosana, misturando-a vigorosamente com o auxílio de uma espátula. A solução de quitosana foi agitada em um homogeneizador Ultra Turrax T18 Basic (IKA®-WERKE) a 700rpm por 2 horas, para evitar a formação de bolhas e se obter uma solução de quitosana completamente dissolvida e padronizada em 1% de quitosana e 1,5% de ácido cítrico.

3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A determinação da CIM e da CBM foi realizada pelo método de diluição em caldo (KIM *et al.*, 1995).

A solução antimicrobiana de quitosana a 1%, obtida pela dissolução da quitosana em solução de ácido cítrico 1,5%, foi adicionada a tubos de ensaio contendo 9,8mL de TSB estéril, de modo que a concentração final ficasse ajustada para 50, 100, 200, 400 e 800µg/mL que equivalem a 0,005 – 0,01 – 0,02 – 0,04 e 0,08% w/v, respectivamente. Em seguida, foi adicionada uma alíquota de 0,1mL (100µL) de suspensão bacteriana a 10⁵ UFC/mL, obtida conforme descrição no item 3.1. Os tubos foram incubados a 35°C com agitação de 200rpm por 24 horas.

Foram realizados os seguintes tratamentos:

- Controle do meio de cultura: meio de cultura (sem solução antimicrobiana de

quitosana e sem inóculo de *L. innocua*).

– Controle positivo: meio de cultura + inóculo de *L. innocua* (sem solução antimicrobiana de quitosana);

– Meio de cultura + solução antimicrobiana de quitosana nas concentrações 0,005% - 0,01% - 0,02% - 0,04% - 0,08% + inóculo de *L. innocua*;

Os tubos com meio de cultura adicionados de solução de quitosana e inóculo foram avaliados visualmente quanto à turbidez e comparados aos seus respectivos controles positivos a fim de determinar através da turbidez quais concentrações ocorreram crescimento microbiano, sendo a menor concentração em que não se observou crescimento (ausência de turbidez) considerada como a Concentração Inibitória Mínima (HAMMER, CARSON; RILEY, 1996). Em seguida, realizou-se a diluições até 10^{-7} e plaqueou-se (alíquota de 0,1mL, em duplicata) em placas com Ágar Oxford (OXA/OXOID). As placas foram incubadas a 35°C/24h, sendo realizada a contagem das colônias de bactérias para determinação da Concentração Bactericida Mínima (RAYBAUDI-MASSILIA; MOSQUEDA-MELGAR; MARTIN-BELLOSO, 2006).

3.4 PRODUÇÃO DO SORVETE E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

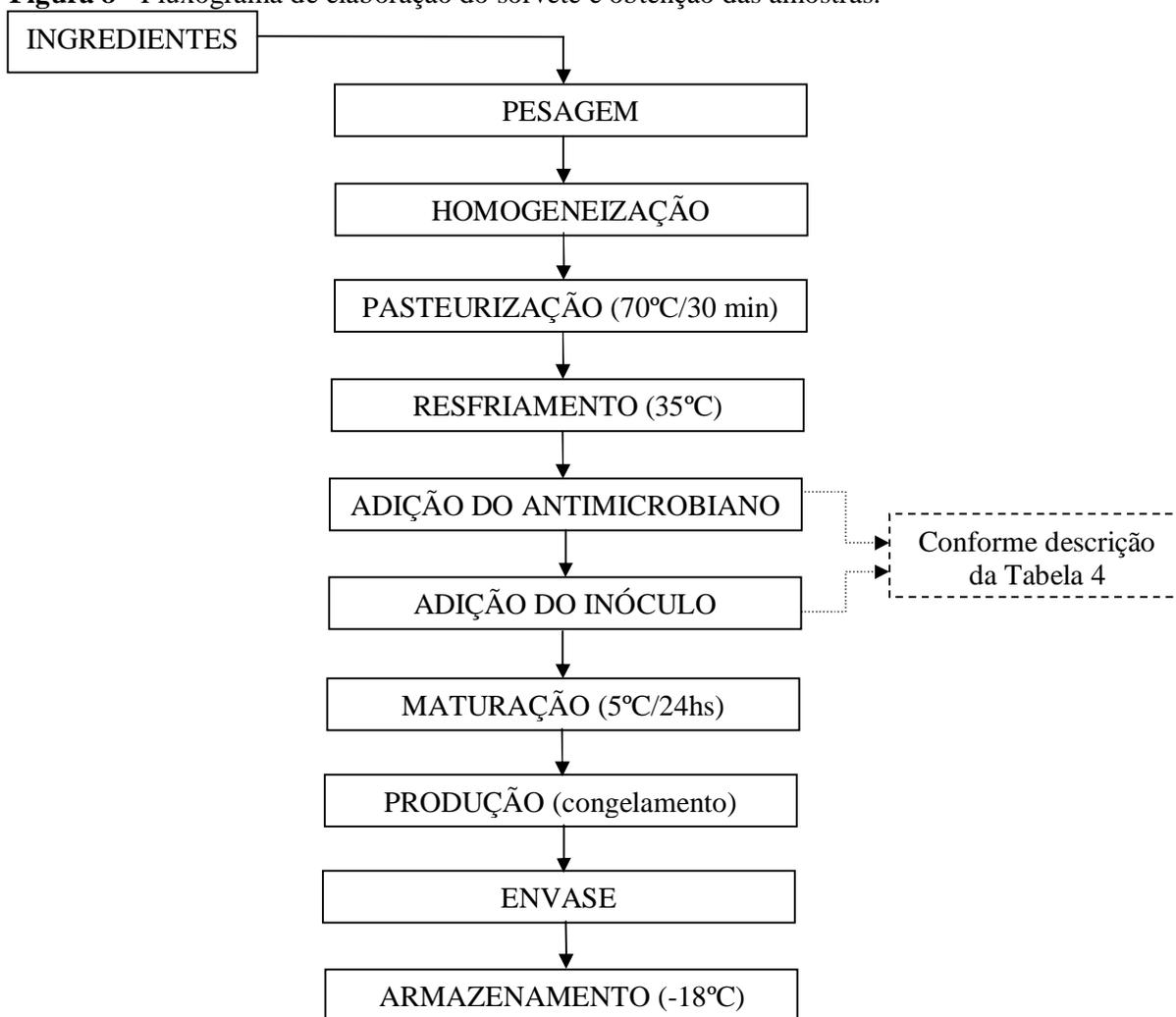
A calda básica para elaboração do sorvete foi preparada e pasteurizada em indústria localizada no município de Caucaia - Ceará e o sorvete foi produzido na Área de Preparo do Laboratório de Microbiologia de Alimentos - Departamento de Tecnologia de Alimentos (DETAL) – Universidade Federal do Ceará (UFC).

Essa etapa, que avalia o efeito antimicrobiano da quitosana sobre *L. innocua* em sorvete foi realizada em duplicata conforme Health Canadá (2010), que recomenda a repetição do experimento em no mínimo duas vezes. O experimento foi constituído por 8 tratamentos (Tabela 4) obtidos conforme fluxograma apresentado na Figura 8.

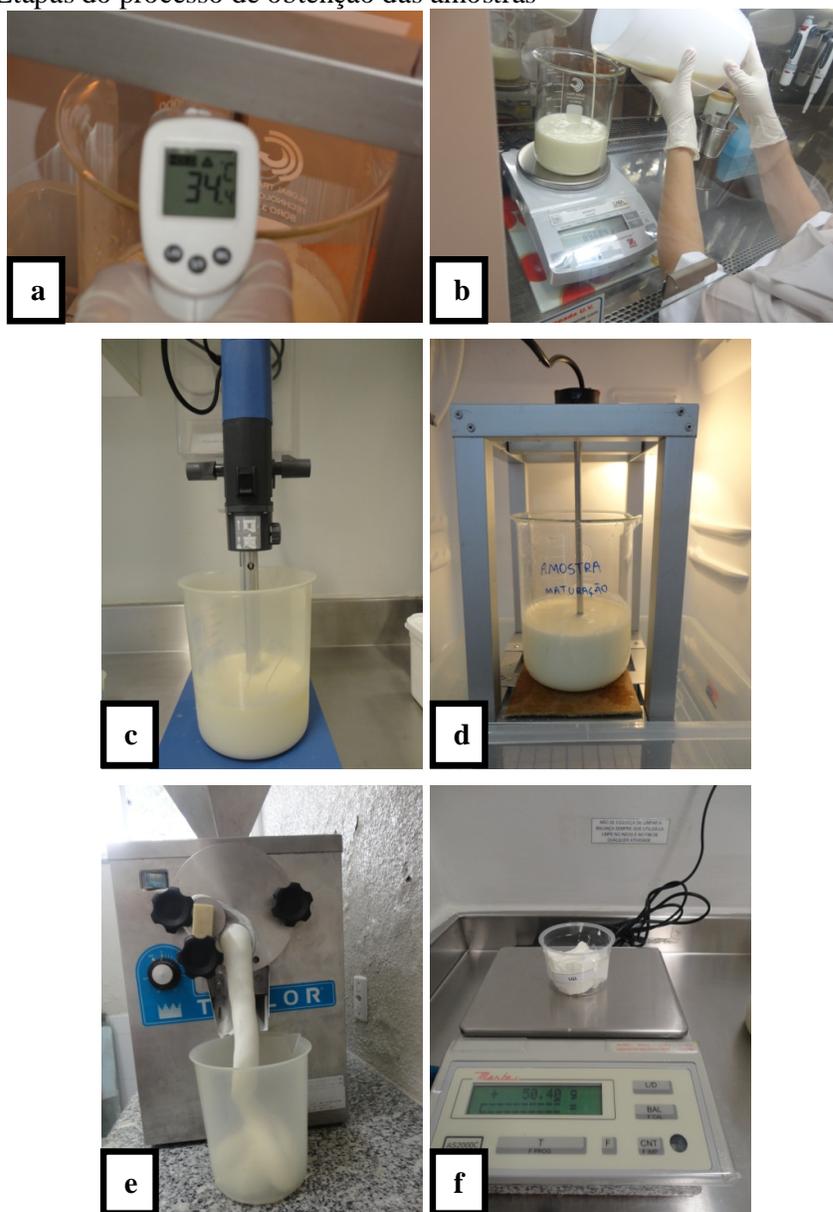
Tabela 4 - Tratamento e descrição das amostras de sorvete.

Tratamento	Descrição
Q0	Sorvete sem quitosana
Q1	Sorvete com 800µg/mL de quitosana
Q2	Sorvete com 1200µg/mL de quitosana
Q3	Sorvete com 1600µg/mL de quitosana
LQ0	Sorvete sem quitosana + <i>Listeria innocua</i>
LQ1	Sorvete com 800µg/mL de quitosana + <i>Listeria innocua</i>
LQ2	Sorvete com 1200µg/mL de quitosana + <i>Listeria innocua</i>
LQ3	Sorvete com 1600µg/mL de quitosana + <i>Listeria innocua</i>

Fonte: Autora (2013).

Figura 8 - Fluxograma de elaboração do sorvete e obtenção das amostras.

Os ingredientes (água, leite em pó integral, açúcar, glicose, gordura e emulsificante) foram pesados e colocados em um tanque pasteurizador (INATEC) provido de agitador e emulsor para que a mistura fosse homogeneizada a medida que estivesse sendo pasteurizada (70°C/30 min.). Logo após a pasteurização, a calda básica, ainda aquecida, foi coletada em potes de plástico descartável e transportada para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos - DETAL/UFC onde foi armazenada sob refrigeração em BOD até que atingisse a temperatura de aproximadamente 35°C (Figura 9a), ótima para o crescimento de *L. innocua*. Em seguida, a calda foi pesada (Figura 9b), adicionada da solução antimicrobiana (solução de quitosana 1%) aos tratamentos descritos na Tabela 4, e a mistura foi homogeneizada em Ultra Turrax T18 Basic (IKA®-WERKE) (Figura 9c). Após homogeneização, o inóculo foi adicionado na concentração de 1% do volume total (calda para sorvete + solução de quitosana + inóculo), totalizando 900mL com base na capacidade de produção do equipamento produtor de sorvete e no volume de inóculo a ser adicionado, sendo, portanto, 9mL. Em seguida, a mistura foi colocada em um equipamento misturador (Figura 9d), dotado de hélice e mantido dentro de uma Incubadora BOD com temperatura regulada a 5°C para maturação por 24 horas e o sorvete foi produzido em um equipamento produtor de sorvete de bancada (TAYLOR) (Figura 9e) com capacidade de 1000mL de calda por batelada. O sorvete foi envasado (Figura 9f) em embalagens de polietileno (50g de sorvete) e os potes foram armazenados sob congelamento (-18°C) pelo período de 60 dias. As amostras inoculadas com *L. innocua* (LQ0, LQ1, LQ2 e LQ3) foram utilizadas para avaliar a atividade antimicrobiana da quitosana e as amostras sem *L. innocua* (Q0, Q1, Q2 e Q3) foram utilizadas para as análises físico-químicas.

Figura 9 - Etapas do processo de obtenção das amostras

Fonte: Autora (2013).

3.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os tratamentos LQ0, LQ1, LQ2 e LQ3 foram submetidos à pesquisa de *Listeria* spp. antes da adição do antimicrobiano (solução de quitosana) e do inóculo (*L. innocua*) à calda básica para sorvete visando identificar a presença ou ausência desse micro-organismo antes da inoculação. Feita a inoculação, foi coletada amostra da calda básica para contagem de *L. innocua* após 30 minutos de homogeneização visando conhecer a concentração inicial de *L. innocua* e após 24 horas de maturação a 5°C. Após a fabricação do sorvete, foi realizada

contagem de *L. innocua* nos seguintes tempos: 0, 1, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento.

As análises dos tempos de todos os tratamentos foram realizadas em duplicata e a partir de uma unidade analítica de 50mL de calda ou 50g de sorvete, sendo todo esse volume transferido para o diluente, conforme Notermans *et al.* (1993).

3.5.1 Pesquisa de *Listeria* spp.

Alíquotas de 0,1mL da calda básica para sorvete foram inoculadas em Ágar Oxfor (OXA/OXOID) e incubadas a 35°C/24h e, em seguida, observou-se a presença ou ausência de colônias típicas de *Listeria* (claras com ponto negro central e rodeadas por um halo preto).

3.5.2 Contagem de *Listeria innocua*

A contagem de *L. innocua* nas amostras foi realizada conforme metodologia recomendada pelo HEALTH PROTECTION BRANCH (PAGOTO *et al.*, 2011). Amostras de 50mL (calda) ou 50g (sorvete) foram diluídas em 450mL de Água Peptonada a 1% (Difco) e preparadas diluições seriadas até 10^{-5} . Em seguida, alíquota de 0,1mL de cada diluição foi inoculada na superfície de placas contendo OXA (em duplicata). As placas foram incubadas a 35°C/24hs e decorrido o tempo foi realizada a contagem das colônias típicas. O resultado foi expresso em UFC/g em função do número de colônias típicas contadas e da diluição inoculada.

3.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As determinações físico-químicas de pH, umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos foram realizadas nos tratamentos sem inoculação com *L. innocua* (Q0, Q1, Q2 e Q3), em triplicata.

3.6.1 pH

A determinação do pH foi realizada por leitura direta em potenciômetro (marca WTW) calibrado anteriormente com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (IAL, 2005).

3.6.2 Umidade

A determinação da umidade foi realizada pelo método de secagem em estufa. Foram pesadas $5,0 \pm 0,1$ gramas da amostra em cápsulas de porcelada previamente secas e pesadas. As amostras foram secas em estufa a 105°C até que se obtivesse peso constante. Antes de cada pesagem, as cápsulas foram resfriadas em dessecador, conforme metodologia descrita pelo IAL (2005).

O resultado, em gramas, foi obtido pela diferença do peso inicial (cápsula + amostra úmida) pelo peso final (cápsula + amostra seca) e expresso em percentagem a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ umidade} = \frac{N \times 100}{P}, \text{ onde:}$$

N = número de gramas de umidade (perda de massa em gramas = peso da amostra úmida – peso da amostra seca)

P = número de gramas da amostra

3.6.3 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração em forno mufla. Foram pesadas $5 \pm 0,1$ gramas da amostra em cadinhos de porcelana previamente secos e pesados. As amostras foram incineradas a 550°C por 24 horas em uma mufla, (QUIMIS, modelo Q 318), conforme AOAC (2005). O resultado em gramas foi obtido por diferença entre o peso final (cadinho + amostra incinerada) e o peso do cadinho.

$$\% \text{ cinzas} = \frac{N \times 100}{P}, \text{ onde:}$$

N = número de gramas de cinzas (peso do cadinho com cinzas – peso do cadinho)

P = número de gramas da amostra

3.6.4 Proteínas

A determinação foi feita pelo método de Kjeldahl nº 46-11 da AOAC (2005), considerando-se 5,70 como fator de conversão para o cálculo de proteína. Foi pesada cerca de 100mg da amostra em papel de filtro, adicionado 1,0g da mistura catalítica e colocado no balão de digestão de Kjeldahl. Foram adicionados 6,0mL de ácido sulfúrico concentrado e

depois o balão foi colocado no digestor de Kjeldahl. Após completa digestão da amostra, o digestor foi desligado e o balão deixado esfriar. O conteúdo do balão foi transferido para um balão volumétrico de 100mL e seu volume completado com água destilada. A amostra diluída foi submetida à destilação e depois à titulação com ácido clorídrico 0,1N até a viragem da coloração verde para róseo.

O resultado foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{Proteína} = \frac{v \times N \times f \times F \times 0,014 \times 100}{P}, \text{ onde:}$$

v = volume de ácido clorídrico 0,1N gasto na titulação;

N = normalidade do ácido clorídrico

f = fator da solução de ácido clorídrico

F = fator de conversão do nitrogênio em proteína (nesse caso, 5,70)

P = peso da amostra (g)

3.6.5 Lipídios

A determinação do teor de lipídios foi feita pelo método de extração de Soxhlet (AOAC, 2005). As amostras secas obtidas na determinação de umidade foram envoltas em papel de filtro e colocadas no aparelho extrator de gordura (TECNAL, modelo TE – 044), onde foi acoplado os tubos receptores de gordura previamente secos e pesados, onde foram adicionados 100mL de hexano P.A. O sistema de extração foi ligado e permaneceu em fluxo por 6 horas. Decorrido o tempo, os tubos foram levados para estufa a 105°C por 2 horas e em seguida colocados no dessecador, onde permaneceram até que fosse atingida a temperatura ambiente para que fossem pesados. O teor de lipídios foi expresso em percentagem (%) através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ gordura} = \frac{N \times 100}{P}, \text{ onde:}$$

N = número de gramas de gordura (peso do tubo com gordura – peso do tubo)

P = número de gramas da amostra

3.6.6 Carboidratos

O teor de carboidrato nas amostras foi determinado por diferença, isto é, 100

menos a somatória das frações de proteína, lipídeos, cinzas e umidade:

$$\% \text{carboidratos} = 100\% - (\% \text{umidade} + \% \text{cinzas} + \% \text{proteína} + \% \text{lipídeos})$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO PARA OS TESTES COM MEIO DE CULTURA E NO SORVETE

As concentrações microbianas inoculadas nos testes para avaliar o efeito antimicrobiano da quitosana em meio de cultura (CIM e CBM) e em sorvete partiram de uma colônia isolada de *L. innocua* ATCC 33090 em TSA+0,6%YE que foi transferida para TSB, como descrito anteriormente. A Tabela 5 apresenta a concentração de *L. innocua* em TSB após 6, 12 e 24 horas de incubação a 35°C.

Tabela 5 - Contagem de *Listeria innocua* ATCC 33090 em TSB após 6, 12 e 24 horas de incubação a 35°C.

DILUIÇÃO	TEMPO (hora) – UFC/mL		
	6	12	24
10 ⁻⁵	Incontável	Incontável	2,1 x 10 ⁸
10 ⁻⁶	1,2 x 10 ⁹	2,8 x 10 ⁹	3,1 x 10 ⁸
10 ⁻⁷	< 25	< 25	< 25

Fonte: Autora (2013).

UGART (2012) cultivou *L. innocua* ATCC 33090 em TSA+0,6%YE, transferiu 1 (uma) colônia de 1mm para 4mL de TSB incubando a 35°C por 23 horas e obteve uma contagem de aproximadamente 3x10⁸ UFC/mL. Este resultado foi semelhante ao encontrado no tempo 24 do presente estudo (Tabela 5). Pode-se observar também que a concentração de *L. innocua* nos tempos 6 e 12 horas foi a mesma (10⁹ UFC/mL), com isso, padronizou-se em 6 horas o tempo de incubação em TSB e o resultado foi confirmado em três repetições do procedimento (Tabela 6).

Tabela 6 - Contagem de *Listeria innocua* ATCC 33090 em TSB após 6 horas de incubação a 35°C.

DILUIÇÃO	REPETIÇÃO – UFC/mL		
	1	2	3
10 ⁻⁵	Incontável	Incontável	Incontável
10 ⁻⁶	1,7 x 10 ⁹	1,8 x 10 ⁹	1,4 x 10 ⁹
10 ⁻⁷	< 25	< 25	< 25

Fonte: Autora (2013).

De acordo com a Tabela 6, a contagem das colônias de *L. innocua* foi feita na diluição 10^{-6} em todas as repetições e o resultado manteve-se em 10^9 UFC/mL.

A diluição 10^{-4} corresponde à concentração 10^5 UFC/mL (Tabela 7), que é a recomendada para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), conforme Scott *et al.* (2005).

Tabela 7 - Contagem de *Listeria innocua* ATCC 33090 nas respectivas diluições após 6 horas de incubação em TSB a 35°C.

DILUIÇÃO	CONTAGEM MICROBIANA (UFC/mL)
Inóculo (TSB)	10^9
10^{-1}	10^8
10^{-2}	10^7
10^{-3}	10^6
10^{-4}	10^5
10^{-5}	10^4
10^{-6}	10^3
10^{-7}	10^2

Fonte: Autora (2013).

Na determinação da concentração de *L. innocua* a ser inoculada no teste com sorvete, foi inoculado $0,5\text{mL}^3$ ($50\mu\text{L}$) das concentrações 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/mL de *L. innocua*, conforme Tabela 7, em 50mL^4 de calda básica para sorvete e analisadas nos tempos 0 (logo após a inoculação) e com 24 horas de armazenamento à 5°C, visando encontrar a concentração que adicionada à calda para sorvete resultasse em uma contagem inicial de 10^5 UFC/mL (Tabela 8).

Tabela 8 - Contagem de *Listeria innocua* ATCC 33090 inoculada em calda básica para sorvete após 0 e 24 horas de armazenamento a 5°C.

CONCENTRAÇÃO INOCULADA (UFC/mL)	TEMPO (hora) – UFC/mL	
	0	24
10^5	$3,1 \times 10^3$	$4,4 \times 10^3$
10^6	$2,4 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$
10^7	$1,8 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
10^8	$1,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$

Fonte: Autora (2013).

³ Corresponde a 1% do volume de calda básica. HEALTH CANADÁ (2010) recomenda um volume de inóculo não superior a 1% da amostra.

⁴ HEALTH CANADÁ (2010) estabelece uma amostra de no mínimo 25g ou mL.

Conforme resultado da Tabela 8, a inoculação de uma concentração de 10^7 UFC/mL de *L. innocua* na calda básica para sorvete resulta em uma contagem inicial de 10^5 UFC/mL. Para confirmação, o teste foi repetido e os resultados estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9 - Contagem de *Listeria innocua* ATCC 33090 na calda básica para sorvete inoculada com 10^7 UFC/mL após 0 e 24 horas de incubação a 35°C.

REPETIÇÃO	TEMPO (hora) – UFC/mL	
	0	24
1	$1,8 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$
2	$1,7 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$

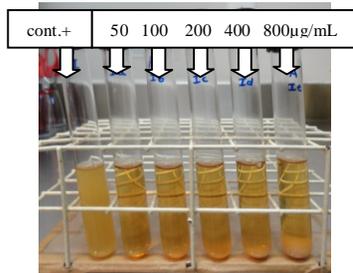
Fonte: Autora (2013).

O resultado mostrado na Tabela 9 confirma que a concentração de 10^7 UFC/mL é a que deve ser utilizada para avaliar o efeito da quitosana sobre *L. innocua* em sorvete. UGART (2012) inoculou 10^7 UFC/mL de *L. innocua* ATCC 33090 em 50g de melão e obteve uma contagem inicial de 10^5 UFC/g.

4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Na Figura 10 é possível observar que a quitosana apresentou efeito inibitório contra *L. innocua*, pois o controle positivo (meio de cultura + inóculo de *L. innocua*, sem solução de quitosana) ficou mais turvo que todos os outros tubos com meio, inóculo e diferentes concentrações de quitosana.

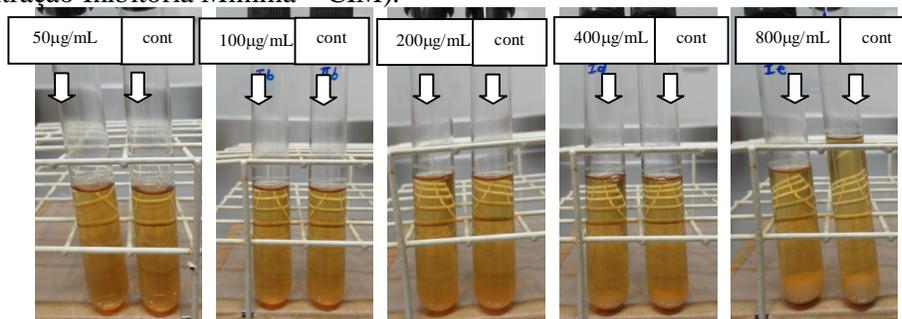
Figura 10 – Efeito da quitosana sobre *Listeria innocua* ATCC 33090 em meio de cultura.



Fonte: Autora (2013).

Contudo, ao avaliar visualmente e comparativamente os tubos contendo meio de cultura, inóculo de *L. innocua* e solução de quitosana nas diferentes concentrações com seus respectivos controles (meio de cultura e solução de quitosana), nota-se que a turbidez entre eles é semelhante, não podendo afirmar se foi decorrente de crescimento microbiano ou efeito da solução de quitosana (Figura 11). Baseando-se na definição de Hammer, Carson e Riley (1996) em que CIM é a menor concentração do antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um micro-organismo, pode-se afirmar que não foi possível identificar um valor de CIM, sendo necessário que todas as concentrações fossem diluídas e plaqueadas até a diluição 10^{-7} para determinação da CBM.

Figura 11– Efeito da quitosana sobre *Listeria innocua* ATCC 33090 em meio de cultura (Concentração Inibitória Mínima – CIM).



Fonte: Autora (2013).

No resultado da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para as diferentes concentrações de quitosana testadas, é possível observar que o controle positivo (meio de cultura + inóculo de *L. innocua*, sem adição de solução de quitosana) apresentou aumento da população bacteriana de 10^5 UFC/mL para 10^9 UFC/mL após incubação a 35°C por 24 horas sob agitação de 200rpm, enquanto o aumento da concentração de quitosana no meio tendeu a reduzir a concentração do inóculo. Sendo CBM a concentração mínima em que nenhum crescimento bacteriano é detectado (RAYBAUDI-MASSILIA; MOSQUEDA-MELGAR; MARTÍN-BELLOSO, 2006), a CBM de quitosana sobre *L. innocua* é, portanto, $800\mu\text{g/mL}$ (Tabela 10).

Tabela 10 – Efeito inibitório de quitosana sobre o crescimento de *Listeria innocua* (Concentração Bactericida Mínima - CBM).

CONCENTRAÇÃO DE QUITOSANA (µg/mL)	CONTAGEM MICROBIANA (UFC/mL)	
	REPETIÇÃO	
	1	2
0	1,0 x 10 ⁹	6,7 x 10 ⁹
50	1,6 x 10 ⁴	9,6 x 10 ⁴
100	1,7 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴
200	5,4 x 10 ³	1,2 x 10 ⁴
400	2,5 x 10 ³	7,5 x 10 ²
800	<10	<10

Fonte: Autora (2013).

Na concentração de 800µg/mL de quitosana (dissolvida em solução de ácido cítrico 1,5%) o pH do meio antes da adição do inóculo era 6,20, ocorrendo uma redução de 1,1 unidades de pH em relação ao pH do meio sem solução de quitosana (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores de pH de TSB com diferentes concentrações de quitosana.

CONCENTRAÇÃO DE QUITOSANA (µg/mL)	pH
0	7,30
50	7,04
100	7,00
200	6,85
400	6,60
800	6,20

Fonte: Autora (2013).

A CBM a 800µg/mL de quitosana pode ser atribuída ao pH do meio nessa concentração ser menor que o controle (meio sem solução de quitosana) e do meio com as demais concentrações de quitosana testadas, o que conseqüente confere maior ação antimicrobiana pois sabe-se que o efeito inibitório da quitosana é maior em pH menor que 7,0, sendo este resultado constatado neste experimento (Tabelas 10 e 11). Esse fato se deve às cargas positivas que a quitosana apresenta quando está em meio ácido (DEVLEIGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004; HELANDER *et al.*, 2001), podendo assim, interagir com as cargas negativas da parede celular das bactérias. (KNOWLES; ROLLER, 2001).

A quitosana utilizada neste estudo, com 95,1% de grau de desacetilação, dissolvida em solução de ácido cítrico 1,5%, na concentração de 800µg/mL, foi mais eficiente

na eliminação de *L. innocua* ATCC 33090 que o estudo realizado por Bento *et al.* (2009), que avaliou a atividade antimicrobiana de quitosana com grau de desacetilação de 85% dissolvida em solução de ácido acético 1% sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, encontrando valor de 5000µg/mL para a Concentração Bactericida Mínima.

Fai (2008) utilizou quitosana com 83% de desacetilação contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Yersinia enterocolitica* e encontrou valores de MIC de 1250µg/mL.

Para Rhoades e Roller (2000) mesmo que os valores de CIM e CBM da quitosana sejam considerados elevados em comparação a outros compostos antimicrobianos como óleos essenciais e bacteriocinas, o amplo espectro de atividade e a baixa toxicidade fazem com que a aplicação de quitosana como antimicrobiano em alimentos seja promissora.

4.3 EFEITO DA QUITOSANA SOBRE *LISTERIA INNOCUA* INCORPORADA NA MATRIZ ALIMENTAR (SORVETE)

É comprovado que a eficiência antimicrobiana da quitosana quando analisada em meio de cultura não é a mesma observada quando esta é aplicada em alimentos (KNOWLES; ROLLER, 2001), por essa razão, a CBM encontrada (800µg/mL) foi a menor concentração de quitosana utilizada nos tratamentos com sorvete e as demais concentrações foram 1200 e 1600µg/mL. Foram testadas concentrações maiores, como 1800 e 2000µg/mL, mas esses tratamentos foram descartados por ter sido observado uma desestabilização das proteínas provocada pela redução do pH em decorrência do ácido utilizado para dissolver a quitosana ou por ação da própria quitosana, já que a adição de quitosana em leite integral ou desnatado (ingrediente do sorvete) provoca a coagulação das micelas de caseína e desestabiliza grande parte das proteínas do soro sem alterar o pH do leite (AUSAR *et al.*, 2001).

4.3.1 Caracterização físico-química das amostras

Os valores de pH e a composição centesimal do tratamento sem quitosana (Q0) e dos tratamentos com diferentes concentrações quitosanas (Q1, Q2 e Q3) são apresentados na Tabela 12. O aumento da concentração de quitosana reduziu o pH, provavelmente em decorrência da maior quantidade de solução ácida adicionada, e conseqüentemente, maior teor de ácido cítrico, no entanto, não foi observada precipitação protéica nas amostras de sorvete desses tratamentos.

Tabela 12 – Valores de pH e composição centesimal de sorvete com diferentes concentrações de quitosana.

COMPONENTES	pH e COMPOSIÇÃO CENTESIMAL (%)*			
	Q0	Q1	Q2	Q3
pH	6,54 ± 0,03	5,86 ± 0,01	5,52 ± 0,03	5,24 ± 0,02
Umidade	64,11 ± 0,04	67,11 ± 0,03	68,06 ± 0,04	68,84 ± 0,07
Cinzas	0,53 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,02	0,46 ± 0,01
Proteínas	3,57 ± 0,03	3,11 ± 0,05	2,87 ± 0,03	2,50 ± 0,07
Carboidrato	27,30 ± 0,05	23,45 ± 0,07	23,34 ± 0,04	23,29 ± 0,05
Lipídio	6,50 ± 0,03	5,86 ± 0,14	5,27 ± 0,02	4,91 ± 0,05

Fonte: Autora (2013).

Q0: Sorvete sem quitosana (controle).

Q1: Sorvete com 800µg/mL de quitosana.

Q2: Sorvete com 1200µg/mL de quitosana.

Q3: Sorvete com 1600µg/mL de quitosana.

* Média de 3 repetições (n=3) ± desvio padrão

Os teores de cinzas, proteínas, carboidratos e lipídeos do sorvete obtido nos diferentes tratamentos reduziram com o aumento da concentração de quitosana devido ao balanceamento dos ingredientes na formulação da calda básica. Verificou-se também aumento no teor de umidade (Tabela 12).

O alimento é uma mistura de diferentes compostos (hidratos de carbono, proteínas, gorduras, sais minerais, vitaminas e outros) os quais podem interagir com a quitosana e provocar a perda ou a melhora do seu potencial antimicrobiano (NO *et al.*, 2007), por isso é imprescindível que sejam conhecidas as características da matriz alimentar em questão, considerando-se os efeitos dos próprios constituintes, o pH do produto, a combinação de procedimentos a que foi submetido e demais aspectos químicos (FAI, 2008).

4.3.2 Pesquisa e contagem de *Listeria innocua* em sorvete com quitosana

Os resultados da pesquisa de *L. innocua* mostram que a calda básica pasteurizada para sorvete foi preparada em condições higiênico-sanitárias satisfatórias, pois não foi detectada presença de *Listeria* spp. em nenhuma das amostras de sorvete antes da inoculação.

A contagem de *L. innocua* logo após inoculação foi de 10⁵ UFC/mL, confirmando o resultado dos testes de padronização (item 4.1 – Tabela 9), em que uma inoculação de 10⁷UFC/mL de *L. innocua* em 50 mL de calda básica para sorvete resultou em uma contagem inicial de 10⁵ UFC/mL. Após a etapa de maturação (5°C/24h) a contagem de *L. innocua* foi a mesma, ou seja, 10⁵ UFC/mL, mostrando que embora *Listeria monocytogenes* cresça sob

refrigeração, o processo de maturação não foi um ponto crítico para o crescimento de *L. innocua*, mesmo no tratamento sem quitosana (LQ0).

As contagens de *L. innocua* logo após o processamento do sorvete e até 60 dias de estocagem congelada a -18°C e susão apresentados nas Tabelas 13 (experimento 1) e 14 (experimento 2).

Tabela 13 – Efeito da quitosana sobre *Listeria innocua* em sorvete (experimento 1).

TEMPO DE ARMAZENAMENTO (dias)	CONTAGEM MICROBIANA (UFC/g)*			
	LQ0	LQ1	LQ2	LQ3
0	2,2 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	5,1 x 10 ⁵
1	1,5 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	6,0 x 10 ⁵
5	1,3 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁵
10	1,3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵
15	1,3 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁵	5,4 x 10 ⁵
30	5,7 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵
45	6,1 x 10 ⁴	8,2 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁵
60	2,8 x 10 ⁴	7,5 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁵

Fonte: Autora (2013).

LQ0: Sorvete sem quitosana + *Listeria innocua* (controle).

LQ1: Sorvete com 800µg/mL de quitosana + *Listeria innocua*.

LQ2: Sorvete com 1200µg/mL de quitosana + *Listeria innocua*.

LQ3: Sorvete com 1600µg/mL de quitosana + *Listeria innocua*.

* Média da duplicata (n=2).

Tabela 14 – Efeito da quitosana sobre *Listeria innocua* em sorvete (experimento 2).

TEMPO DE ARMAZENAMENTO (dias)	CONCENTRAÇÃO MICROBIANA (UFC/g)*			
	LQ0	LQ1	LQ2	LQ3
0	6,9 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵
1	9,8 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵
5	8,5 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵
10	9,1 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	8,1 x 10 ⁴
15	7,3 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	6,6 x 10 ⁴
30	3,5 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	6,0 x 10 ⁴
45	6,4 x 10 ⁴	9,0 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁵	4,2 x 10 ⁴
60	5,7 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁵	3,9 x 10 ⁴

Fonte: Autora (2013).

LQ0: Sorvete sem quitosana + *Listeria innocua* (coontrole).

LQ1: Sorvete com 800µg/mL de quitosana + *Listeria innocua*.

LQ2: Sorvete com 1200µg/mL de quitosana + *Listeria innocua*.

LQ3: Sorvete com 1600µg/mL de quitosana + *Listeria innocua*.

* Média da duplicata (n=2).

No experimento 1, o tratamento LQ0 apresentou 1 (uma) redução exponencial com 30 dias de armazenamento a -18°C. A mesma redução foi observada nos tratamentos LQ1 e LQ2 somente após 45 dias, e o tratamento LQ3, embora com maior concentração de quitosana, não apresentou redução exponencial da concentração de *L. innocua*.

No experimento 2, os tratamentos LQ0 e LQ1 reduziram 1 (um) expoente da concentração de *L. innocua* com 45 dias de armazenamento. Os tratamentos LQ2 e LQ3 apresentaram resultados diferentes do experimento 1, pois LQ2 não reduziu a concentração de *L. innocua* em 60 dias de armazenamento e em LQ3 apresentou uma redução exponencial com apenas 10 dias de armazenamento a -18°C.

As concentrações de quitosana utilizadas no sorvete (800, 1200 e 1600µg/mL) não apresentaram efeito antimicrobiano satisfatório como ocorreu no meio de cultura, na qual em 800µg/mL de quitosana não foi detectado crescimento de *L. innocua*.

Tiwari *et al.* (2009) ressalta o fato de a quantidade de conservantes naturais necessária para se ter atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos em produtos alimentares ser consideravelmente maior que as utilizadas em estudos *in vitro*, mostrando que o efeito é menor em sistema alimentares do que em meios de cultura. Isso se deve ao fato de as substâncias aniônicas presentes nos produtos alimentícios, como gorduras e proteínas, reagirem com os radicais catiônicos da quitosana e dessa forma, atuarem competitivamente na interação com as cargas aniônicas da parede celular das bactérias (KNOWLES; ROLLER, 2001), assim como foi verificado no presente trabalho a eficiência antimicrobiana da quitosana na concentração de 800µg/mL sobre *L. innocua* em meio de cultura (CBM) e a não eficiência nessa mesma concentração no sorvete, podendo ser sugerido que as concentrações de proteína, carboidrato e gordura (Tabela 12) do sorvete, possivelmente interagiram com a quitosana, inibindo sua ação.

Health Canadá (2010) recomenda uma redução de no mínimo 3 ciclos logarítmicos na concentração de *Listeria monocytogenes* pós processamento para considerar a ação de um antimicrobiano efetiva. Esse fato não ocorreu nas concentrações de quitosana testadas sobre *L. innocua* em sorvete (Tabela 15).

Tabela 15 - Redução logarítmica de *Listeria innocua* em sorvete no período de 60 dias.

TRATAMENTO	REDUÇÃO LOGARÍTMICA (LOG ₁₀ UFC/g)*	
	EXPERIMENTO	
	1	2
LQ0	0,89	1,07
LQ1	0,38	1,31
LQ2	0,38	0,22
LQ3	0,52	0,45

Fonte: Autora (2013).

LQ0: Sorvete sem quitosana + *Listeria innocua* (controle).

LQ1: Sorvete com 800µg/mL de quitosana + *Listeria innocua*.

LQ2: Sorvete com 1200µg/mL de quitosana + *Listeria innocua*.

LQ3: Sorvete com 1600µg/mL de quitosana + *Listeria innocua*.

*Valores obtidos por diferença entre a concentração inicial (t=0) e a concentração final (t=60).

No presente trabalho foi possível observar que embora não tenha ocorrido crescimento de *L. innocua* entre as etapas de inoculação e o final da maturação, em que a calda básica para sorvete foi armazenada a 5°C por 24 horas, a bactéria permaneceu viável mesmo a temperatura de congelamento (-18°C) em que o sorvete foi armazenado no período de 60 dias. É importante destacar a necessidade de medidas que evitem a contaminação de alimentos por *Listeria* spp., devido sua elevada resistência à baixas temperaturas. Fato constatado em um estudo desenvolvido por Palumbo e Williams (1991), em que praticamente 100% das células viáveis de *Listeria monocytogenes* foram recuperadas a partir de sorvete armazenado por 14 semanas à -18°C.

A adoção de padrões microbiológicos com exigência de ausência de *Listeria monocytogenes* em alimentos por parte de diversos países visa assegurar um produto isento de risco para o consumidor, pois embora uma única célula deste micro-organismo, provavelmente, não seja suficiente para causar listeriose, sua capacidade de multiplicação durante a estocagem de alimentos, mesmo sob refrigeração, faz com que a sua presença no alimento coloque em risco a saúde dos consumidores mais susceptíveis (gestantes, crianças e imunodeprimidos) (CATÃO; CEBALLOS, 2001).

O uso da quitosana em alimentos com finalidade antimicrobiana é comum na forma de revestimentos ou coberturas aplicadas principalmente em frutas. Poucas pesquisas utilizam a quitosana como ingrediente adicionado diretamente ao produto, como no caso do presente estudo. Além disso, é necessária uma maior quantidade de pesquisas que avaliem o efeito da quitosana como antimicrobiano em diferentes matrizes alimentares, já que a composição do alimento é um dos fatores que interfere na sua efetividade.

5 CONCLUSÃO

A quitosana apresentou efeito inibitório sobre *Listeria innocua* ATCC 33090 em meio de cultura, mas não foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima pela análise de turbidez do meio nos tubos; já a Concentração Bactericida Mínima que inibiu o crescimento de *L. innocua* ATCC 33090 foi de 800µg/mL de quitosana.

As concentrações de 800, 1200 e 1600µg/mL de quitosana não apresentaram efeito antimicrobiano sobre *L. innocua* ATCC 33090 em sorvete com 23,29 à 27,30% de carboidrato, 2,50 à 3,57% de proteína e 4,91 à 6,50% de lipídio.

REFERÊNCIAS

AIEDEH, K., TAHA, M. O. Synthesis of iron-cross linked chitosan succinate and iron-crosslinked hydroxamate chitosan succinate and their in vitro evaluation as potential matrix materials for oral theophylline sustained-release beads. **European Polymer Journal**, v. 13, p. 159–168, 2001.

AMIOT, J. **Ciência y tecnología de la leche**. Zaragoza: Acribia, 547p., 1991.

ANDRE, P.; ROOSE, H.; VAN NOYEN, R.; DEJAEGHER, L.; UYTENDAELE, I.; de SCHRIJVER, K. Listeriose neuro-meningee associee a la consummation de creme glatee. **Medicine et Maladies Infectieuses**; v. 20, p. 570-572, 1990.

ARMONDES, M. P. O. **Aspectos microbiológicos e higiênico-sanitários de sorvete em suas etapas de elaboração, produzidos artesanalmente na cidade de Goiânia**. 1998. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto de Patologia e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETE (ABIS). Disponível em: <http://www.abis.com.br/estatistica_producaoconsumodesorvetesnobrasil.html> Acesso em: 11 de Junho de 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18. ed. Maryland: AOAC, 2005.

AUSAR, S. F.; BIANCO, I. D.; BADINI, R. G.; CASTAGNA, L. F.; MODESTI, N. M.; LANDA, C. A.; BELTRAMO, D. M. Characterization of casein micelle precipitation by chitosans. **Journal of Dairy Science**. v. 84, n. 2, p. 361-369, fev. 2001.

AVILA, A. J.; COSTAMAGNA, V.; BARRIENTOS, E.; PUCCI, G.; SÁNCHEZ, E.; STRUMIA, M. C.. Películas de quitosano con sorbato de potasio unido física y covalentemente. Estudios de aplicación. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 11, n. 2, p. 73-87, 2010.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Listeria**: A practical approach to the organism and its control in foods. Blackie Academic & Professional: London. 150 p., 1998.

BENKERROUM, N.; DAOUDI, A.; HAMRAOUI, T.; GHALFI, H.; THIRY, C.; DUROY, M.; EYRART, P.; ROBLAIN, D. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 56-63, 2005.

BENTO, R. A.; STAMFORD, T. L. M.; de CAMPOS-TAKAKI, G. M.; STAMFORD, T. C. M.; de SOUZA, E. L. Potential of chitosan from *Mucor Rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 583-589, set. 2009.

BEVERLYA, R. L. JAMES, M. E.; PRINYAWIWATKUL, W. NO, H. K. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 534-537, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999. **Aprova o regulamento técnico referente a gelados comestíveis preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 29 abr. 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/379_99.htm>. Acesso em: 10 nov. 2011

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº12, de 2 de janeiro de 2001. **Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2 jan. 2001. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 15 mar. 2012.

CAMPANIELLO, D.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M; CORBO, M. R. Chitosan: Antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries. **Food Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 992-1000, 2008.

CASARTELLI, A. **Gelati: Qualitativamente Migliori Con Il Sistema HACCP**. IL Latte, v. 21, n. 7, p. 72-79, 1996.

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios no Estado da Paraíba (Brasil). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 281, 2001.

CHUNG, Y. C., SU, Y. P., CHEN, C. C., JIA, G., WANG, H. L., WU, J. C. G., LIN, J. G., Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 7, p. 932-936, 2004.

CHUNG, Y. C., WANG, H. L., CHEN, Y. M., LI, S. L. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 179-184, 2003.

COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 368p., 2004.

CRIADO, M. T.; SUÁREZ, B.; FERRERÓS, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, v. 48, n. 2, p. 123-126, 1994.

CURTIS, L. **Listeria**. 2007. Disponível em: <http://foodsafetywatch.com/public/499print.cfm>. Acesso em: 12 jun. 2013.

DAIRY FOOD SAFETY VICTORIA (DFSV). **A review of the technical issues for ice cream products**. Austrália. 2001. Disponível em: <<http://www.dairysafe.vic.gov.au/contents/documents.html>>. Acesso em: 16 jun. 2013.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, p. 703-14, 2004.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTIVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**. 2ª ed. Washington, 2001.

DUTTA, P. K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, jun. 2009.

DUTTA, P. K., DUTTA, J., TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, n. 1, p. 20–31, 2004.

EARLY, R. **Tecnologia de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 459p., 2000.

FAI, A, E. C. **Potencial do efeito antibacteriano de quitosana extraída de *Mucor circinelloides* UCP 050: uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. 2008. 94p. Dissertação – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

FANG, S. W.; LI, C. F.; SHIH, D. Y. C. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 2, p. 136-40, 1994.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Agency Response letter GRAS Notice N° GRN 000170**. 2005. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListing/ucml154586.html>. Acesso em: 17 jun. 2013.

GALLARDO, C. S.; DIZ BENGOCHEA, M.; GONZÁLEZ, J. A.; CASTRO, M. G.; LÓPEZ, L. A. R. Helados Artesanos: niveles microbiológicos tras la implantación de un sistema APPCC. **Alimentaria: Revista de Tecnología e higiene de los alimentos**, v. 318, n. 37, p. 19-24, dez. 2000.

GOFF, H. D. 65 years of ice cream science. **International Dairy Journal**, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.006>>. Acesso em: 25 nov. 2011.

GOFF, H. D.; VERESPEJ, E; SMITH, A. K. A study of fat and air structures in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 817-829, 1999.

GOUGOULI, M.; ANGELIDIS A. S.; KOUTSOUMANIS, K. A study on the behavior of *Listeria monocytogenes* in ice cream stored under static dynamic chilling and freezing conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 523-530, 2008.

GOULD, G. W. Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, v.45, p.82-85, 1995.

GRANGER, C.; LEGER, A.; BAREY, P.; LANGENDORFF, V.; CANSSELL, M. Influence of formulation on the structural networks in ice cream. **International Dairy Journal**, v.15, n. 03, p. 255-262, 2005.

HAJDENWURCEL, J. R. A experiência da indústria de laticínios na implantação do sistema APPCC – estudo de caso. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 57c, n. 327, Juiz de Fora – MG, jul/ago. 2002.

HAMMER, K. A; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of melaleuca alternifolia (tea tree oil). **American Journal of Infection Control**, v. 24, n. 3, p. 186-189, 1996.

HEALTH CANADA, **Listeria monocytogenes Challenge Testing of Ready-to-Eat Refrigerated Foods**, v.1, 2010. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/legislation/pol/listeria-monocytogenes-eng.pdf. Acesso em: 16 fev. 2012.

HEALTH PROTECTION BRANCH (MFLP-74). **Enumeration de Listeria monocytogenes in foods**. Compendium Analytical Methods. Ottawa, 2001.

HELANDER, I. M., NURMIAHO-LASSILA, E. L., AHVENAINEN, R., RHOADES, J., ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 235–244, 2001.

HERNANDEZ-LUZARDO, A. N., BAUTISTA-BANOS, S., VELAZQUEZ-DEL VALLE, M. G., MENDEZ-MONTEALVO, M. G., SANCHEZ-RIVERA, M. M., BELLO-PEREZ, L. A. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 541–547, 2008.

HONG KONG. Microbiological Risk Assessment of Ice Cream. Risk Assessment Studies. **Food and Environmental Higiene Department Queensway Government Offices**, Hong Kong, v. 7, set. 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Micro-organisms in Foods 6 – Microbial Ecology of Food Commodities**. Blackie Academic & Professional: London, 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **El Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos: su aplicación a las industrias de alimentos**. Acribia, 332p., 1991.

JEON, Y. J.; SHAHIDI, F.; KIM, S. K. Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. **Food Reviews International**, v. 16, n. 2, p. 159-76, 2000.

JIANG, L. **Comparasion of disk diffusion, agar dilution, and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing of five chitosan**. 2011. 65f. Thesis (Master of Science) – Faculty of the Lousiana State University and Agricultural and mechanical college, China 2011. Disponível em: <td.lsu.edu/docs/available/etd-06072011-103035/unrestricted/(Jiang)thesis.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2013.

JIANG, Z. NEETOO, H.; CHEN, H. Congtrol of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using chitosan-based antimicrobial coating and films. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 22-26, 2011.

KEENEY, P. G.; KROGER, M. Frozen dairy products. In: WEBB, B. H.; ALFORD, J. A. **Fundamentals of dairy chemistry**, 2 ed. Westport: Avi Books, cap. 14, 1987.

KIM, J. M.; MARSHALL, J. A.; CORNELL, J. F.; WEI, C. I. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella Typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1364-1368, 1995.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S. Efficacy of chitosan, carvacrol and a hydrogen peroxide-based biocide against food borne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1542-1548, 2001.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51-63, 2010.

KONG, M., CHEN, X. G., LIU, C. S., LIU, C. G., MENG, X. H., YU, L. J. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, p. 197–202, 2008a.

KONG, M., CHEN, X. G., LIU, C. S., YU, L. J., JI, Q. X., XUE, Y. P., CHA, D. S., PARK, H. J. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. **Frontiers of Materials Science in China**, v. 2, p. 214–220, 2008b.

KOREA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (KFDA). **Food additives code**. Seoul, Korea: KFDA, 1995.

KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 117–120, 1998.

LAKE, R.; CRESSEY, P.; HUDSON, A. Risk profile: *Listeria monocytogenes* in ice cream. **Institute of Environmental Science and Research Limited**. New Zealand. 49p. 2009.

LECLERCQ-PERLAT, M. N.; LALANDE, M. Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. **Journal of Food Engineering**, v. 23, n. 4, p. 501-517, 1994.

LEUBA, J. L.; STOSSEL, P. **Chitosan and other polyamines: antifungal activity and interaction with biological membranes**. In: Muzzarelli, R.; Jeuniaux, C.; Gooday, G. W. editors. Chitin in nature and techonology. New York: Pienum Press, p 215-22, 1986.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Varela, 599p. 1996.

MARSHALL, R. T., ARBUCKLE, W. S. **Ice cream**. Chapman & Hall, 1996.

MARSHALL, R. T.; GOFF, H. D.; HARTEL, R. W. **Ice cream**. 6th ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publ., 366p, 2003.

MELLO, K.G.P.C.; BERNUSSO, L.C.; PITOMBO, R.N.M.; POLAKIEWICZ, B. Synthesis and physicochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. **Brazilian Archives of Biology & Technology**, v.49, n.4, p. 665, 2006.

MILIKITA, I. S.; CÂNDIDO, L. M. B. **Fabricação de sorvetes: Perigos significativos e pontos críticos de controle**. Revista Brasil Alimentos, n. 26, jul-ago, 2004.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, v. 1, p. 107-121, 2004.

MOSQUIM, M. C. A. **Fabricando sorvete com qualidade**. São Paulo: Varela, 62p, 1999.

NO, H. K.; MEYERS, S. P.; PRINYAWIWATKUL, W.; XU, Z. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, p. 87-100, jun./jul. 2007.

NO, H. K., KIM, S. H., LEE, S. H., PARK, N. Y., PRINYAWIWATKUL, W. Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 174–178, 2006.

NO, H. K., PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antimicrobial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal Food Microbiology**, v. 74, p. 65-72, 2002.

NOTERMANS, S.; VELD, P.; WIJTZES, T.; MEAD, G. C. A User's Guide to Microbial Challenge Testing for Ensuring the Safety and Stability of Food Products. **Food Microbiology**, v. 10, p. 145-157, 1993.

PALUMBO, S. A.; WILLIAMS, A. C. Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. **Food Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 63-68, 1991.

PAPINEAU, A. M.; HOOVER, D. G.; KNORR, D.; FARKAS, D. F. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. **Food Biotechnology**, v. 5, p. 45-57, 1991.

PEREDA, J. A. O. *et. al.* **TENOLOGIA DE ALIMENTOS: Alimentos de Origem Animal**. Vol. 2. Editora Artmed. São Paulo. 2005.

PONCE, A. G.; ROURA, S. I.; del VALLE, C. E.; MOREIRA, M. R. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *in vitro* and *in vivo* studies. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 294-300, 2008.

RAAFAT, D., SAHL, H. G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. **Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 186–201, 2009.

RABEA, E. I., BADAWY, M. E. T., STEVENS, C. V., SMAGGHE, G., STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1457–1465, 2003.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTIN-BELLOSO, O. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* e *Listeria innocua* in fruit juices. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 7, p. 1579-1586, 2006.

RHOADES, J.; ROLLER, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 80-86, 2000.

RYSER, E. T. Foodborne listeriosis. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (eds). **Listeria, listeriosis and food safety. Second Edition**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999.

SAGOO, S.; BOARD, R.; ROLLER, S. Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. **Food Microbiology**, v. 19, p.175-82, 2002.

SATAKE, S.; CLARK, N.; RIMLAND, D.; NOLTE, F. S.; TENOVER, F. C.; Detection of vancomycin-resistant enterococci in faecal samples by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2325-2330, set. 2003.

SCOTT, V. N.; SWANSON, K.; FRIER, T. A.; PRUETT JR., W. P.; SVEUM, W. H.; HALL, P. A.; SMOOT, L. A.; BROWN, D. G. Guidelines for Conducting *Listeria monocytogenes* Challenge Testing of Foods. **Food Protection Trends**, v. 25, n. 11, p. 818-825, 2005.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y-J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.

SOLER, M. P.; VEIGA, P. G. Série Publicações Técnicas do Centro de Informação de Alimentos: sorvete. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2001.

SUDARSHAN, N. R.; HOOVER, D. G.; KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, v. 6, p. 257-72, 1992.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin: The Undisputed Biomolecule of Great Potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 61-87, 2003.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; O'DONNELL, C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5987-6000, 2009.

TSAI, G. J.; SU, W. H.; CHEN, H. C.; PAN, C. L. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. **Fisheries Science**, v. 68, p. 170-7, 2002.

TSAI, G. J., SU, W. H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 239-243, 1999.

UGART, S. D. M. **Atividade antimicrobiana da cobertura comestível de quitosana adicionada com trans-cinamaldeído sobre *Escherichia coli* e *Listeria innocua* em melão cantaloupe (*Cucumis melo L.*)**. 2012. 96p. Dissertação. Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

VAN DER JAGT, A. J. **HACCP in de Consumptieijis industrie**. Trends in de productie van voedingsmiddelen. VMT, n. 24, nov. 1994.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Introducción. In: _____. **Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología** (Serie Alimentos Básicos 1). Zaragoza: Acribia, 1994.

VICENTE, A. M.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M. **Manual de Indústrias dos Alimentos**. São Paulo: Varela, 599p, 1996.

WANG, X. H., DU, Y. M., LIU, H. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 21–26, 2004.

WARKE, R.; KAMAT, A.; KAMAT, M.; THOMAS, P. Incidence of Pathogenic Pyschotrophs in Ice Creams Sold in Some Retail Outlets in Mumbai, Indía. **Food Control**, v. 11, p. 77-83, 2000.

WEINER, M. L. **An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients**. In: Brine, C. J.; Sandford, P. A.; Zikakis, J. P., editors. *Advances in chitin and chitosan*. London. U.K.: Elsevier, p. 663-777, 1992.

XIE, W.; XU, P. X.; LIU, Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11 p. 1699-1701, 2001.

XING, K., CHEN, X. G., LIU, C. S., CHA, D. S., PARK, H. J. Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular or intracellular targets. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 127–133, 2009.

YANG, T. C., CHOU, C. C., LI, C. F. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 237–245, 2005.

YE, M.; NEETOO, H.; CHEN, H. Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 260-268, 2008.

YOUNG, D. H.; KOHLE, H.; KAUSS, H. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension cultured Glycine max and *Phaseolus vulgaris* cells. **Plant Physiology**, v. 70, n. 5, p. 1449-1454, 1982.

ZHENG, L.; ZHU, J. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, dez. 2003.

ZHONG, Z. M., XING, R. G., LIU, S., WANG, L., CAI, S. B., LI, P. C. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities *in vitro*. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 566–570, 2008.