

**UFRRJ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**Enriquecimento de Sorvete com Microrganismos Probióticos**

**Guilherme Andrade de Carvalho**

**2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ENRIQUECIMENTO DE SORVETE COM MICRORGANISMOS  
PROBIÓTICOS**

**GUILHERME ANDRADE DE CARVALHO**

Sob a Orientação da Professora  
**Verônica Lobato**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de *Magister Scientiae* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, Rio de Janeiro  
Janeiro de 2006

637.1277

C331e

T

Carvalho, Guilherme Andrade de, 1978-  
Enriquecimento de sorvete com microrganismos  
probióticos / Guilherme Andrade de Carvalho. – 2005.  
50 f.: il.

Orientador: Verônica Lobato.  
Dissertação (mestrado) –  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro, Instituto de Tecnologia.  
Bibliografia: p. 39-42.

1. Laticínios - Bacteriologia -  
Teses. 2. Microbiologia dos  
laticínios - Teses. 3. Sorvetes,  
gelados, etc. - Teses. 4. Lactobacilo  
- Teses. 5. Alimentos funcionais -  
Teses. 6. Tecnologia de alimentos -  
Teses. I. Lobato, Verônica, 1961-.  
II. Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Instituto de Tecnologia.  
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

GUILHERME ANDRADE DE CARVALHO

Dissertação submetida ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Laticínios, como requisito parcial para a obtenção do grau de *Magister Scientiae*, em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO (TESE) APROVADA EM 25 de janeiro de 2006

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Verônica Lobato - UFRRJ

---

Prof. Dr. Robson Maia Franco - UFF

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Djalva Maria da Nóbrega Santana - UFRRJ

## DEDICATÓRIA

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, ao SENAI/RJ ( Centro de Tecnologia de Alimentos e Bebidas), à minha família, pelo amor, carinho, apoio, incentivo, e a todos que contribuíram de alguma maneira.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Verônica Lobato

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosa Helena Luchese, pela colaboração e apoio.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Djalva Maria da Nóbrega Santana, pelo incentivo e colaboração.

Ao Prof. Dr. Antônio Tavares da Silva, pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. José Francisco Pereira Martins pela colaboração.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Soraia Borges Vilela, pelo incentivo e amizade.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Arlene Gaspar pela colaboração.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Sandra Gregório pela colaboração.

Aos pais, Honório e Clarice, pelo incentivo e amor.

Ao avô Lauro (*in memoriam*), de quem herdei a paixão por sorvete , eterna saudade.

À avó Clary pelo amor, carinho e fornecimento de um grande diferencial para o sorvete.

Ao querido irmão Luís Fernando pelo auxílio.

À Ellen Mayra da Silva Menezes pela colaboração.

Ao Luís Fernando Martins e Silva pela colaboração.

À empresa Duas Rodas (Jaraguá do Sul) pela colaboração.

À Camila Gandin Rodrigues /Bruno Frias (Corn Products Brasil) pela colaboração.

Ao Romulo Cardoso Vilela pela ajuda.

Ao Wallace de Oliveira / Vitor de Melo - Centro de Tecnologia de Alimentos e Bebidas – SENAI/FIRJAN.

À Edina Rodrigues (Dina), técnica de laboratório, pela colaboração.

Ao Dylo Feliciano de Jesus pelo auxílio.

Ao CNPq pela concessão da bolsa durante o curso.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

## Lista de Abreviaturas

CMC: Carboxi metil celulose

FDA: Food and Drug Administration

HBL: Balanço Hidrolítico/ Lipofílico

LFC: Leite Fermentado Comercial

MRS: Man, Rogosa e Sharpe

PAFs: Proteínas afetadas pelo frio

S0: Sorvete após congelamento total

S25: Sorvete vinte e cinco dias após congelamento total

S40: Sorvete quarenta dias após congelamento total

SNGL : Sólidos Não Gordurosos do Leite

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

## Lista de Quadros

<b>Quadro 1.</b> Composição média de sorvete (em 100 g).....	10
<b>Quadro 2.</b> Composição do leite em pó integral (em %).....	11
<b>Quadro 3.</b> Classificação dos sorvetes segundo seu teor de gordura.....	12
<b>Quadro 4.</b> Adoçantes e agentes de corpo nas sobremesas geladas.....	13
<b>Quadro 5.</b> Percentagem de água congelada em relação à temperatura de retirada na produtora.....	20
<b>Quadro 6.</b> Microrganismos de interesse alimentar em alimentos minimamente processados.....	21
<b>Quadro 7.</b> Concentração microbiana de <i>Lactobacillus</i> no inóculo; na calda e no sorvete após processo e com 20 e 40 dias de armazenagem.....	30
<b>Quadro 8.</b> Concentração microbiana de <i>Lactobacillus</i> no inóculo, no sorvete após processo, e no anterior com 25 dias de armazenagem.....	30
<b>Quadro 9.</b> Concentração microbiana de <i>Lactobacillus</i> no inóculo, no sorvete após processo, e no anterior com 25 dias de armazenagem.....	30
<b>Quadro 10.</b> Temperatura de arraste do sorvete enriquecido com probióticos.....	36

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Linhagens de <i>Lactobacillus casei</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Gráfico de consumo <i>per capita</i> mundial de sorvete no ano de 2001.....	9
<b>Figura 3.</b> Fluxograma de fabricação de sorvete.....	23
<b>Figura 4.</b> Fluxograma do preparo do inóculo de “LFC”.....	25
<b>Figura 5.</b> Fluxograma de processamento do sorvete com microrganismos probióticos.....	27
<b>Figura 6.</b> Concentração de microrganismos probióticos na calda e no sorvete nos períodos de 0, 20 e 40 dias.....	30
<b>Figura 7.</b> Valores em percentagem de transmitância do inóculo, dos sorvetes após 0, 25 e 40 dias processado em caldo MRS, como controle, obtidas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas.....	31
<b>Figura 8.</b> Valores em percentagem de transmitância da cultura e do sorvete após processado em caldo MRS com 0,3 % de sais biliares obtidas nos intervalos de 0, 6, 30 e 48 horas.....	32
<b>Figura 9.</b> Valores em percentagem de transmitância dos sorvetes após 25 e 40 dias processado em caldo MRS com 0,3 % de sais biliares obtidas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas.....	32
<b>Figura 10.</b> Valores em percentagem de transmitância do inóculo e dos sorvetes após 0, 25 e 40 dias processado em caldo MRS com 0,3 % de sais biliares obtidas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas.....	33
<b>Figura 11.</b> Valores em percentagem de transmitância do inóculo e dos sorvetes após 0, 25 e 40 dias processado em caldo MRS com 0,3 % de sais biliares obtidas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas.....	34
<b>Figura 12.</b> Leituras de valores em percentagem de transmitância da cultura e do sorvete após processado em caldo MRS ácido obtidas nos intervalos de 0, 6, 30 e 48 horas.....	34
<b>Figura 13.</b> Leituras de valores em percentagem de transmitância dos sorvetes após 25 e 40 dias processado em caldo MRS ácido obtidas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas.....	35
<b>Figura 14.</b> Valores em percentagem de transmitância em caldo MRS ácido com inóculo e sorvetes 0, 25 e 40 dias processado, sob a temperatura de 30°C em 0, 6, 24, 48 horas.....	35
<b>Figura 15.</b> Valores em percentagem de transmitância em caldo MRS ácido com inóculo e sorvetes 0, 25 e 40 dias processado, sob a temperatura de 30°C em 0, 6, 24, 48 horas.....	36

## sumário

<u>1. INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos funcionais dos probióticos .....	4
2.2. Adequação da tecnologia de produtos lácteos probióticos.....	5
2.3. Características do gênero.....	5
2.4. <i>Lactobacillus casei</i> .....	6
2.5. Definições, classificação e composição .....	8
2.5.1. Definições segundo a Legislação Nacional.....	10
2.5.2. Composição.....	10
2.6. Ingredientes utilizados no sorvete e suas funções.....	11
2.6.1. Leite em Pó Integral .....	11
2.6.2. Gorduras.....	12
2.6.3. Açúcares.....	13
A. Sacarose.....	13
B. Lactose .....	14
C. Dextrose (Glucose).....	14
D. Maltodextrina .....	14
2.6.4. Emulsificante.....	15
2.6.5. Estabilizantes. ....	15
2.7. Processo de Fabricação.....	16
2.7.1. Preparo da Mistura .....	16
2.7.2. Homogeneização .....	17
2.7.3. Pasteurização .....	17
2.7.4. Maturação .....	18
2.7.5. Adição de Microrganismos Probióticos.....	18
2.7.6. Aeração e Congelamento Parcial .....	19
2.7.7. Envase .....	20
2.7.8. Congelamento Total .....	20
2.7.9. Estocagem .....	20
2.7.10. Distribuição.....	20
2.8. Injúria Microbiana pelo Congelamento.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Formulação experimental.....	24
3.2. Equipamentos Utilizados.....	24
3.3. Preparação da cultura probiótica.....	25
3.4. Processamento do sorvete.....	26
3.5. Análises microbiológicas.....	27
3.5.1. Contagem de <i>Lactobacillus casei</i> isolada de produto comercial .....	27
3.5.2. Teste de Resistência a Sais Biliares.....	28
3.5.3. Teste de Resistência à Acidez.....	28
3.6. Análises Físico-químicas .....	28
3.6.1. Determinação da temperatura de Arraste.....	28
3.6.2. Determinação de pH.....	28
4. Resultados e DISCUSSÃO.....	29
4.1. Contagem de <i>Lactobacillus</i> .....	29
4.2. Crescimento Controle.....	31
4.3. Resistência a Sais Biliares.....	32
4.4. Resistência à acidez.....	34
4.5. Temperatura de Arraste.....	36
4.6. Potencial de Hidrogênio.....	37

5. CONCLUSÕES.....	38
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXO I. COMPOSIÇÃO DO SORVETE (PORT 379, 26 DE ABRIL DE 1999/ ANVISA) .....	43
ANEXO II. RESOLUÇÃO RDC Nº 266, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005.....	45
ANEXO III. INIBIÇÃO E ESTIMULAÇÃO DOS MICRORGANISMOS POR CONDIMENTOS.....	49

## RESUMO

CARVALHO, Guilherme Andrade de. **Enriquecimento de sorvete com microrganismos probióticos**. Seropédica: UFRRJ, 2005

Nos últimos anos, o alimento funcional, capaz de conferir efeitos benéficos à saúde humana, vem tendo uma importância considerável na alimentação, por ocasionar efeitos positivos e melhorar o bem-estar e a saúde, além de possivelmente reduzir riscos de algumas patologias. O sorvete compreende uma sobremesa láctea gelada, mas de consumo ocasional e assim considerado como alimento de conveniência. Trata-se de um produto com características refrescantes, unidas às características nutricionais. No experimento avaliou-se a viabilidade do enriquecimento de sorvete com microrganismos probióticos, analisando a presença das cepas do inóculo na calda e no sorvete, detectadas em unidades formadoras de colônia por mililitro, e como taxa de sobrevivência microbiana no processamento e armazenamento do alimento probiótico. Para isto foi realizado o isolamento e o repique de espécies de *Lactobacillus* sp. provenientes de leites fermentados comerciais, originando inóculos que foram adicionados na elaboração do sorvete em três processamentos diferentes. Análises de contagem em meio não seletivo para o cultivo de bactérias lácticas foram realizadas durante o período de 40 dias assim como testes de resistência a sais biliares e a acidez. Nas condições experimentais comprovou-se a viabilidade microbiana de probióticos de *Lactobacillus* em concentrações aceitáveis (superior a  $10^6$  ufc/mL) para enquadrá-lo como alimento funcional.

Palavras-chave: sorvete, probióticos, alimentos funcionais, tecnologia de alimentos, viabilidade microbiana.

## ABSTRACT

CARVALHO, Guilherme Andrade de. **Ice cream enrichment with probiotics microorganisms**. Seropédica: UFRRJ, 2005

At the last years, the functional food, that is able to confer health effects, has having a consider importance on eating, that occasion better to be goodness and health, over there to reduce risks of some diseases. Ice cream is a freeze dairy desert, but of occasional consumption and then considered like conventional food. This product deal with cooling characteristics, connected with high nutritious and therapeutics value. That experiment evaluate the enrichment of ice cream with probiotics microorganisms, and their viability in final product, analyzing the presence of microorganisms from inoculated on syrup and on ice cream, detected at unit formed colony for millilitre, represented likely rate microbial survival on process and on storage of probiótico food. For this was realized the isolation and the prick again of species of *Lactobacillus* sp. provided from commercial fermented milk, originating cultures which was ingredient on ice cream elaboration at three different manufacturing process. This was elaborated with water, milk powder, sugar, vegetable fatness, dextrose, maltodextrina and emustab, and was storage in temperature of - 20°C; counting analysis in no selective medium for cultivation of *Lactobacillus* were realized during the period of 40 days, as well as resistance tests to bile and acidity. In the conditions of experiment proved the microbial viability of probiotics of *Lactobacillus* in acceptable concentration (higher than  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>) to frame it like functional food.

Key-words: ice-cream, probiotics, functional foods, food technology, microbial viability

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o desenvolvimento acelerado do mundo industrializado tem afetado drasticamente o estilo de vida do homem moderno e as conseqüências deste crescimento tem provocado um desequilíbrio intenso na qualidade de vida da população mundial, onde a grande maioria passou a consumir dietas inadequadas, com aumento do sedentarismo, uso do tabaco, estresse, hipertensão, doenças crônicas degenerativas gerando assim um grande impacto para a saúde dos indivíduos. Estas transformações no estilo de vida de algumas pessoas têm levado à intensa procura por alimentos, que além de suprir as suas necessidades nutricionais, contribuam com benefícios à saúde e ao bem estar, proporcionando melhor qualidade de vida e prevenindo o aparecimento de determinadas doenças.

Atento às expectativas da população mundial, a indústria de alimentos, notadamente a laticinista, vem desenvolvendo novas modalidades de alimentos, que contribuam e atendam às exigências do mundo moderno. Estes são os chamados alimentos funcionais, que a cada dia ganham lugar de destaque, junto aos consumidores que se preocupam com o seu bem estar, por estarem relacionados com a promoção da qualidade de vida do indivíduo.

Probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde humana. Incluem-se neste grupo os lactobacilos e as bifidobactérias vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde. Após uma série de estudos, aumentam as comprovações dos benefícios oriundos da ingestão de microrganismos probióticos. Vários produtos lácteos, contendo culturas probióticas têm sido formulados nos últimos anos e comercializados com sucesso.

Sorvetes são classificados pela legislação brasileira como gelados comestíveis, assim, são congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas ou de uma mistura de água e açúcares e que podem ser adicionados de outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto (BRASIL, 2005). A mesma portaria define os preparados para gelados comestíveis como sendo os produtos que, após serem submetidos ao congelamento, resultam em gelados comestíveis, não necessitando da adição de outros ingredientes.

No Brasil, o sorvete ainda é um alimento de consumo sazonal e identificado pelo consumidor como guloseima. Mas a sua caracterização como um alimento e ainda com propriedades funcionais poderá mudar a atual característica de consumo. Para isso o setor sorveteiro deverá trabalhar mais, estimulando e garantindo o consumo de sorvete ao longo de todo ano, independente de condições climáticas. Assim, este mercado possui um grande potencial de crescimento e há muito espaço a ser conquistado com produtos diferenciais e inovadores.

O leite e ou derivados lácteos são ingredientes obrigatórios nos sorvetes, portanto, permitem a veiculação de microrganismos potencialmente benéficos à saúde do consumidor, como são os microrganismos probióticos, desde que esta presença não descaracterize sensorialmente o produto.

Com adoção de sorvete em merenda escolar, como ocorre no estado de São Paulo, este se torna um potencial veículo de probióticos para crianças que não possuem consumo rotineiro e assim justificando-se o seu enriquecimento, aumentando seu valor nutricional e possivelmente melhorando a saúde de seus consumidores.

Aliando-se a aceitação popular do sorvete e a funcionalidade dos microrganismos benéficos à saúde, como os probióticos, avaliou-se a viabilidade da

utilização do sorvete à veiculação destes, de forma a aumentar o consumo dos alimentos classificados como funcionais. Para isto, foram fabricados sorvetes de creme inoculados com *Lactobacillus*.

O objetivo do trabalho foi avaliar a injúria microbiana de *Lactobacillus casei* no processamento de sorvete e a sua viabilidade após todo o processo de fabricação, introduzindo-o no segmento de alimentos funcionais agregando-se valor ao sorvete através de seu enriquecimento com probióticos. A resistência microbiana foi analisada, detectando possíveis mudanças nas características dos lactobacilos. Nos processamentos experimentais utilizaram-se procedimentos operacionais padrões para a elaboração do sorvete, inoculando-se microrganismos isolados de produtos lácteos, com isso garantindo um controle da qualidade do sorvete enriquecido com probióticos.

Este trabalho justificou-se na avaliação da viabilidade de um projeto de desenvolvimento de um novo produto alimentício, determinando a possibilidade da massa de sorvete ser um produto constituído de microrganismos probióticos, como o iogurte e outras bebidas lácteas, objetivando um enriquecimento nutritivo do sorvete, inserindo-o na categoria de alimentos funcionais. A cultura de *Lactobacillus casei* utilizada foi isolada de leites fermentados comerciais e repicados em leite tornassolado e reconstituído. Esta cultura foi refrigerada e adicionada à massa de sorvete após a maturação da mesma, visando avaliar sua viabilidade.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

O sorvete apresenta-se como um veículo adequado para o resgate de probióticos na dieta humana. Alguns estudos têm demonstrado que é possível a produção de sorvete inoculado, tipo um iogurte congelado (ALAMPRESE et al, 2002).

A expectativa é de que assim como está ocorrendo no Japão, Estados Unidos e Europa, o Brasil deverá entrar com força neste mercado. Estudos demonstram cada vez mais os efeitos saudáveis de certas substâncias contidas nos alimentos, demonstrando que a alimentação é um fator crítico para o controle da saúde. Acredita-se que a exemplo dos Estados Unidos, que hoje movimenta cerca de US\$ 92 bilhões/ano com o mercado de funcionais, o Brasil deverá nos próximos anos contar com várias empresas atuando neste segmento (ALMEIDA et al., 2001).

De acordo com alguns estudos científicos a manutenção da microbiota saudável pode proporcionar proteção contra desordens gastrintestinais, incluindo infecções gastrintestinais, doenças inflamatórias do intestino e, até mesmo, neoplasias (HAENEL & BENDING, 1975; MITSUOKA, 1982; SALMINEN et al., 1998).

Os microrganismos mais amplamente utilizados pela indústria de alimentos pertencem ao grupo das bactérias lácticas, embora algumas leveduras também sejam utilizadas. Deste grupo os mais comumente utilizados são as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que usualmente são adicionados em leites fermentados na forma liofilizada, sendo que as do gênero *Lactobacillus* são mais freqüentemente consideradas como seguras ou reconhecidamente seguras “Generally Recognized as Safe” (GRAS) (COLLINS et al. 1998; ZIEMER & GIBSON, 1998; LEE et al., 1999).

Apesar das culturas probióticas de *Lactobacillus* spp. e de *Bifidobacterium* spp. serem consideradas GRAS, torna-se necessária a determinação da segurança na utilização da cepa antes do lançamento e da divulgação de um novo produto. Assim uma avaliação crítica da segurança tornará os benefícios dos probióticos acessíveis ao consumidor (SALMINEM et al., 1998, O'BRIEN et al., 1999).

A presença dos chamados alimentos de “terceira geração” no mercado brasileiro ainda é incipiente e o desenvolvimento de pesquisas, divulgação e comercialização destes produtos para a população brasileira têm um papel muito importante, pois promoverão uma maior disponibilidade destes produtos no mercado, levando ao aumento do consumo e abrindo novas perspectivas tecnológicas para a indústria de alimentos (FERREIRA, 2003).

As primeiras citações pelo historiador romano Plínio em 76 aC, sobre os efeitos benéficos de microrganismos vivos no trato intestinal remontam à antiguidade sobre o uso de leites fermentados no tratamento de várias formas de infecções intestinais (O' SULLIVAN, 1992).

Segundo GOLDIN (1998), a palavra probiótico foi introduzida por LILLY & STILLWELL, em 1965, para descrever microrganismos que desempenham atividades benéficas. KURMMANN (1988) e FULLER (1994) definem probióticos como microrganismos vivos que, quando consumidos agem no trato gastrointestinal do hospedeiro melhorando o balanço intestinal.

A designação de probióticos é conhecida há mais de 35 anos, mas foi FULLER que em 1991 os definiu como alimentos suplementados com microrganismos que produzem efeitos benéficos no hospedeiro através da melhora do seu balanço

microbiano intestinal. Os probióticos fazem parte do grupo denominado “alimentos funcionais”, cujo principal alvo é a mucosa intestinal e sua microflora, estando incluídos neste grupo o iogurte e outros leites fermentados e que vêm apresentando um crescimento vertiginoso e que estão disponíveis em vários formatos e formulações para o consumo (FERREIRA, 2003).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2002), Probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo.

Os alimentos probióticos estão disponíveis em vários formatos como formulação para animais, produtos farmacêuticos, produtos de confeitarias e produtos lácteos fermentados ou não. A indústria de laticínios está entre as que apresentam maior crescimento na disponibilização de produtos funcionais, em especial nos segmentos de iogurtes e outros leites fermentados, onde essa funcionalidade é efetivada por meio da utilização de culturas probióticas e/ou adição de substâncias prebióticas (FERREIRA, 2003).

Nas diferentes regiões do trato intestinal estão presentes grupos específicos de microrganismos como bactérias bífidas (predominância no cólon) e lactobacilos (predominância no intestino delgado), que modulam a microbiota num micro-ambiente, por meio de seus produtos e metabolismo. Para obterem-se os benefícios máximos faz-se necessário que os microrganismos devam estar viáveis e disponíveis em concentrações superiores a  $10^6$  UFC/g para *Lactobacillus* ssp. e  $10^7$  UFC/g para *Bifidobacterium* ssp. (FERREIRA, 2003)

A colonização das bactérias lácticas probióticas no intestino delgado se faz pelo consumo contínuo de alimentos carregando níveis  $10^6$  UFC/g de *Lactobacillus*. Segundo FERREIRA, 2003 a predominância de *Lactobacillus* diminui os processos putrefativos no trato intestinal, diminuindo o acúmulo de substâncias nocivas, promovendo uma vida mais saudável para o hospedeiro. Esta teoria ficou conhecida como “Teoria da Longevidade”.

## **2.1. Aspectos funcionais dos probióticos:**

Segundo GOLDIN (1998) & MADLEY (2001) são atribuídas várias funções aos microrganismos probióticos tais como:

- Diminuição do colesterol sérico e da reabsorção de compostos aminados indesejáveis,
- Aumento da absorção de minerais como cálcio, ferro e magnésio,
- Aumento da resposta do sistema imune do hospedeiro,
- Favorece o metabolismo de algumas substâncias como o da lactose em indivíduos intolerantes à anterior,
- Aderência à parede epitelial, habilidade de estabilizar a microbiota intestinal,
- Possui propriedades antigenotóxicas e não patogênicas,
- Prevenção de câncer, redução do colesterol, infecções no trato urinário, alergias inflamações e hipersensibilidade.

## **2.2. Adequação da tecnologia de produtos lácteos probióticos**

Segundo FERREIRA (2003), os produtos lácteos probióticos devem ser produzidos utilizando-se as mesmas tecnologias empregadas no processamento dos produtos lácteos não probióticos, levando em consideração alguns fatores que devem ser citados para garantir sua funcionalidade, tais como:

- Adequação da cultura levando em conta o público alvo: criança /adulto,
- Funcionalidade esperada,
- Sobrevivência em leite,
- Não alterar o sabor característico do produto,
- Resultar em produto com textura esperada,
- Produção de ácido na taxa esperada ou ser carregada na forma concentrada,
- A cultura deve ser resistente à acidez do produto e às rápidas mudanças de pH após a digestão,
- Deve resistir à presença de bile e de outras secreções intestinais,
- Capacidade de não produzir substâncias indesejáveis,
- Habilidade de passar pelo trato gastrointestinal em estado viável,
- Estar presente em elevada concentração celular ao final da fermentação,
- Habilidade de se multiplicar no trato gastrointestinal.

## **2.3. Características do gênero:**

Conforme dados de Gomes e Malcata citados por FERREIRA (2003), os *Lactobacillus* apresentam as seguintes características:

- Apresentam-se na forma de bacilos ou coco bacilos,
- São Gram positivos e asporogênicos,
- Ocorrem aos pares ou formando correntes curtas,
- Isolados de boca, vagina e intestino,
- São anaeróbios facultativos ou microaerofílicos,
- São catalases negativos e benzidina negativos,
- Algumas linhagens podem produzir uma pseudocatalase e outras estirpes podem apresentar motilidade,
- Crescem na faixa de dois a 53°C,
- O conteúdo de G + C é entre 32 a 55 mols%,

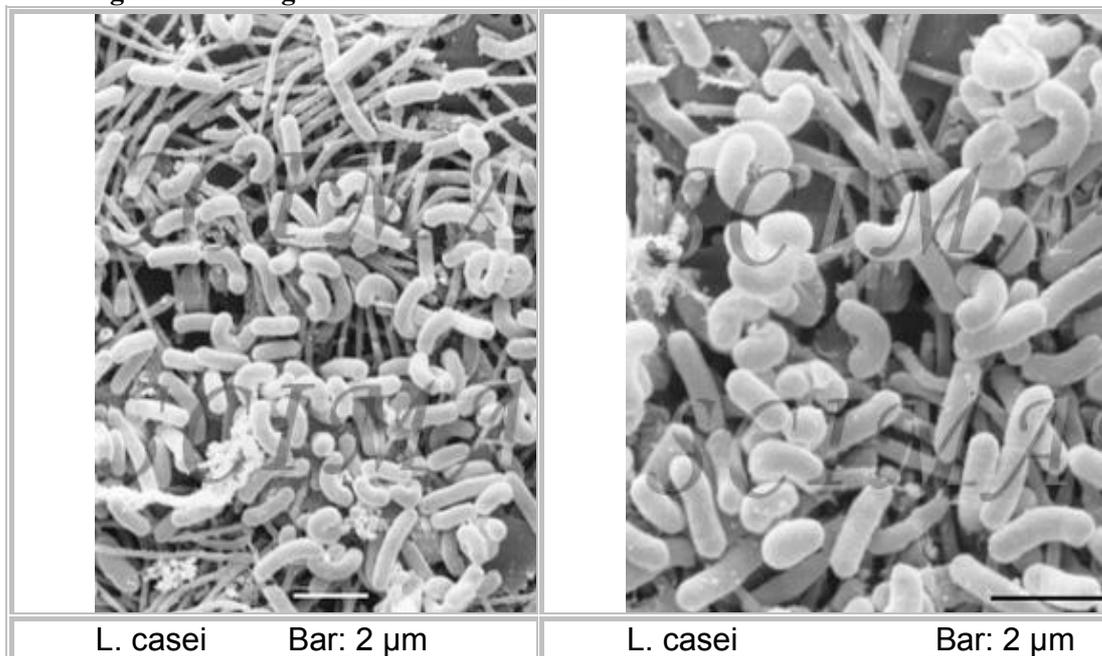
- São autotolerantes ou anaeróbios,
- Formam isômeros do ácido láctico: L(+), D(-), DL,
- Fermentação de glicose: Homofermentativo/Heterofermentativo,
- Crescimento pH 4,5 = + , pH 9,0 = - .

#### 2.4. *Lactobacillus casei*

O *Lactobacillus casei* é um microrganismo homofermentativo e apresenta temperatura ótima de crescimento a 37°C e mínima de 15°C. O pH ótimo de crescimento é 6,8; com mínimo em torno de 3,0 (RASIC & KURMANN, 1983; FERREIRA, 1987).

*Lactobacillus casei* são microrganismos Gram positivos, anaeróbicos facultativos, imóveis, sem formação de esporos, com forma de bastão (Figura 1), membro industrialmente importante das bactérias ácido-láticas . O *L. casei* são tolerantes aos ácidos e possui um metabolismo fermentativo com produção majoritária de ácido láctico. O seu desenvolvimento ocorre a 15°C mas não a 45°C e requer riboflavina, ácido fólico, pantotenato de cálcio e fatores de desenvolvimento de niacina. (KANDLER & WEISS, 1986).

**Figura 1. Linhagens *Lactobacillus casei***



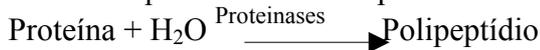
As glândulas do estômago humano secretam uma solução concentrada de ácido clorídrico resultando um valor de pH próximo a 1,0 (MEISAMI et al., 1987). Condição em que algumas linhagens de lactobacilos são capazes de sobreviver ao suco gástrico, assim como aos sais biliares e têm demonstrado efeito inibitório no crescimento de microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes* e *Shigella sonnei* (KANDLER & WEISS, 1986). Também tem sido empregado como

agente profilático, reduzindo o período de diarreia associada à administração de ampicilina e a reincidência de colite pseudomembranosa causada pelo *Clostridium difficile* (GILLILAND, 1979; GORBACH et al., 1987; FERNANDES et al., 1988). Estudos clínicos indicam a ação deste microrganismo no tratamento de diarreia infantil, estabilização da permeabilidade intestinal, balanço da microflora intestinal, redução das enzimas fecais, tratamento da superfície de bexiga com câncer, aumento da imunidade e avanços em vacinas (TAMINE, 2002).

As atividades metabólicas de lactobacilos segundo FULLER (1992) são responsáveis por seus benefícios terapêuticos. Os lactobacilos cultivados no meio leite executam as seguintes atividades:

#### A - Proteólise:

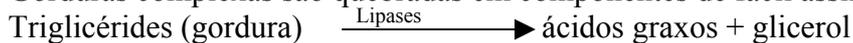
Proteínas quebradas em componentes de mais fácil assimilação:



As proteinases, que executam sua função, são provenientes de lactobacilos. Estas atividades dos lactobacilos no trato gastrointestinal facilitam a digestão, propriedade de relevante importância na nutrição infantil, geriátrica e na recuperação de saúde.

#### B-Lipólise:

Gorduras complexas são quebradas em componentes de fácil assimilação.



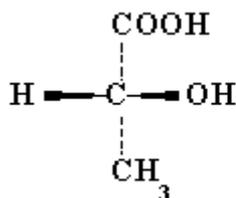
Evidências de testes clínicos têm revelado que lactobacilos podem quebrar colesterol em lipídeos simples, auxiliam no desligamento de sais biliares e ambas as características possuem significância clínica.

#### C-Metabolismo da Lactose:

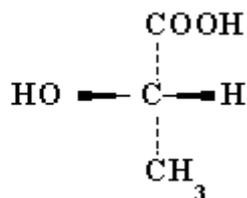
As bactérias ácido-láticas possuem enzimas  $\beta$ -galactosidase, glicolase e desidrogenase láctica ("LDH") que produzem ácido láctico a partir da lactose. O ácido láctico possui benefícios fisiológicos, tais como:

- Aumento de digestibilidade de proteínas lácteas por precipitação destas em partículas finas de coalho;
- Proveitosa utilização de cálcio, fósforo e ferro;
- Estimulação da secreção de sucos gástricos;
- Aceleração do movimento avançado do conteúdo estomacal;
- Serve como fonte de energia no processo de respiração;

Os níveis de isômeros ópticos de ácido láctico produzidos dependem da natureza da cultura. As configurações desses isômeros estão apresentadas a seguir:



D(-) ácido láctico



L(+) ácido láctico

Ambos isômeros são absorvidos pelo trato intestinal. Enquanto que L(+) ácido láctico é completamente e rapidamente metabolizado em síntese de glicogênio, o D(-) ácido láctico é metabolizado em razão menor e o ácido não metabolizado é excretado

na urina. A presença de ácido láctico não metabolizado resulta em acidose metabólica em crianças. O *Lactobacillus acidophilus* produz a forma D(-) e por esta razão, o benefício clínico é discutível. *L. sporogenes*, por sua vez, produz somente L(+) ácido láctico, sendo, conseqüentemente, preferido.

A habilidade dos lactobacilos na conversão de lactose à ácido láctico é utilizada com sucesso no tratamento de intolerância à lactose. Pessoas que sofrem desta disfunção, não conseguem metabolizar a lactose por falta ou não adequação do sistema enzimático essencial. Ácido láctico, por redução de pH do intestino a valores entre 4,0 e 5,0 inibe o desenvolvimento de organismos putrefativos e *E. coli* que requer um ótimo pH entre 6,0 e 7,0. Alguns dos ácidos voláteis produzidos durante a fermentação possuem atividade antimicrobiana sob condições de baixo potencial de oxi-redução.

#### **D - Produção de bacteriocinas**

As bacteriocinas são proteínas ou complexos protéicos de atividade bacteriana direcionada às espécies que são competidoras, relacionadas à produção bacteriana. A atividade inibitória de *Lactobacillus* direcionada a organismos putrefativos é parcialmente realizada pela produção de bacteriocinas.

#### **E - Produção de outras substâncias desejáveis**

As bactérias ácidas lácticas também inibem o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes, através dos produtos metabólicos como o peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e diacetil.

#### **F-Síntese de Vitaminas**

Experimentos em produtos lácteos fermentados têm revelado que culturas lácticas requerem vitaminas tipo B para suas atividades metabólicas, sintetizando vitaminas deste complexo.

### **2.5. Definições, classificação e composição**

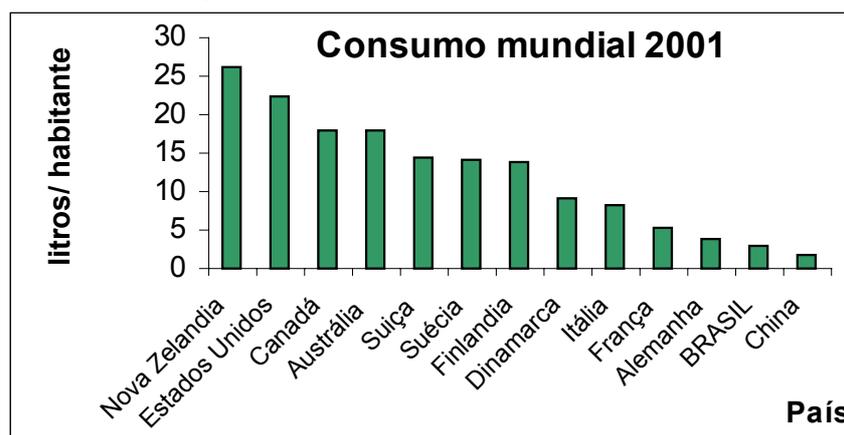
As definições, classificação e composição são apresentadas de acordo com a Resolução RDC nº. 266 de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005) referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis, em anexo.

O sorvete é um produto de boa aceitação sensorial, pelo consumidor, tendo no Brasil uma boa perspectiva para crescimento comercial, bastando o respeito a diretriz do Sincongela (Sindicato da Indústria Alimentar de Congelados, Supercongelados, Sorvetes, Concentrados e Liofilizados no Estado de São Paulo): “Um bom sorvete se faz com a escolha adequada dos ingredientes, um processo de fabricação eficiente, criatividade e muito carinho”. Conforme destaca documento da entidade, produzir sorvetes é um negócio lucrativo. Versátil e rico em opções, esse mercado movimentou cerca de US\$ 836 milhões em 2004. Pelos dados da Associação Brasileira de Indústrias de Sorvete, o consumo per capita em 2002 esteve na faixa de 3 litros de sorvete/ano por habitante, superando a média dos anos anteriores que se situava ao redor de 2 litros. Número muito distante da média *per capita* de alguns países, como os EUA e Canadá, com 21,7; Oeste europeu, com 8,7; Chile, com 4,6; Argentina, 4,1; e Uruguai, com 3,3. Por esses dados, percebe-se o quanto esse mercado pode crescer, sobretudo considerando-se o clima brasileiro. (ALMEIDA et al, 2001)

O sorvete é um produto congelado aerado, obtido pelo congelamento, sob agitação, de uma mistura pasteurizada de ingredientes alimentícios tais como produtos lácteos, adoçantes, estabilizantes, gorduras e outros.

Muitas formulações para sorvetes existem no mercado, todas apresentando basicamente as mesmas características de formulação. Sua estrutura física é um sistema físico-químico bastante complexo (constituído de células de ar, dispersas em uma fase líquida contínua, embebida em cristais de gelo).

**Figura 2. Gráfico de consumo *per capita* mundial de sorvete no ano de 2001 (litros de sorvete/ habitante).**



Fonte: Associação Brasileira de Indústrias de Sorvete

Desde os tempos mais remotos, egípcios e persas, árabes e romanos saboreavam o sorvete que teve sempre sua história associada à nobreza, à culinária requintada, aos banquetes suntuosos, enfim, à arte de servir bem. Diz a tradição que o veneziano Sartorelli, em 1850, lançou em Londres nada menos do que 900 carrocinhas ambulantes de sorvetes italianos. Conta-se também que Carlos I da Inglaterra, pagava o fabuloso ordenado de vinte libras esterlinas, por ano, ao seu cozinheiro especializado na confecção de sorvetes (ALMEIDA et al., 2001). Segundo os mesmos autores, desde sua origem e até os dias de hoje, produzir sorvetes é e continuará sendo um negócio lucrativo e de fácil alcance para um novo empreendedor que se disponha a trabalhar bem.

O sorvete passou a ser conhecido no Brasil em 1834, quando o navio norte-americano Madagascar aportou no Rio de Janeiro, carregando 217 toneladas de gelo. Dois comerciantes começaram a fabricar sucos e sorvetes artesanais com frutas nativas, utilizando o nome de 'gelados'. Em janeiro de 1836, o italiano Luigi Bassino passou também a fabricar sorvetes. A história conta apenas que até 1941 a evolução do sorvete deu-se de forma artesanal. Fatos referentes à curiosidade que o sorvete provocava os sabores exóticos e as formulações que diferenciavam e tornavam famosos este ou aquele sorveteiro. O ano de 1941 foi histórico e representou o início da sorveteria industrial, em altos volumes de produção e utilizando-se a tecnologia do frio. De 1942 até 1980 a indústria de sorvetes apresentou crescimento constante, tendo hoje à disposição do consumidor uma imensa variedade de produtos como bolos gelados, torta de frutas, cones de biscoitos e outras combinações (BACCARIN, 1982).

Em sua análise do mercado, Osvaldo Costa, gerente de Vendas da Danisco Cultor, destaca que os fabricantes de sorvetes de médio porte têm apresentado

crescimento expressivo nos últimos anos. Por meio da distribuição junto às cadeias de supermercados, fortaleceram-se de forma a tornar o produto mais acessível ao consumidor. O maior consumo deve-se ao aumento do número de frízeres nos lares, possibilitando o crescimento de categorias como “take home”, que ainda é uma tendência em crescimento (ALMEIDA et al., 2001). Outro ponto que o autor destaca é que as tecnologias em ingredientes e equipamentos para a fabricação de sorvetes encontram-se hoje disponíveis para empresas de diferentes portes.

No Brasil, o sorvete está muito associado ao verão, como uma guloseima refrescante e não como um alimento nutritivo, com variedades de sabores e formulações, que permitem seu consumo nas mais diversas ocasiões em qualquer época do ano. Osvaldo Costa lembra que na Europa, por exemplo, o marketing está voltado para o “prazer” de se consumir um sorvete, independente do momento ou época do ano (ALMEIDA et al., 2001). A mentalidade brasileira é um aspecto que o setor sorveteiro precisa trabalhar mais, pois seu mercado tem um grande potencial de crescimento e há muito espaço a ser conquistado com produtos inovadores. Um ponto que merece a reflexão do setor sorveteiro é o estímulo ao consumo do produto durante o inverno, lançando sorvetes especiais para serem consumidos nessa estação.

**Quadro 1. Composição média de sorvete com diferente composição lipídica (g/100g)**

Nutrientes	(10,2g/100g gordura)	(6g/100g gordura)	(3g/100g gordura)
Carboidratos, g	9,4	9,1	12
Gordura, g	4,9	2,9	1,2
Proteínas, g	1,6	2,1	1,5
Energia, Kcal	208	165	144
Cálcio, mg	56	61	47
Riboflavina, mg	0,14	0,14	0,14
Retinol, µg	69	38	15

Fonte: PEDROSO

(2000)

ALAMPRESE et al. (2002) verificaram os efeitos da adição de *Lactobacillus johnsonii* La1 em sorvetes recém-manufaturados armazenados em duas diferentes temperaturas de congelamento e contendo duas diferentes concentrações de açúcar e gordura, provando que é possível produzir sorvete não fermentado manufaturado a varejo contendo bactérias probióticas.

### 2.5.1. Definições segundo a Legislação Nacional

Segundo Resolução RDC nº. 266 (BRASIL, 2005) Gelados Comestíveis: são produtos alimentícios obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e 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 a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo.

### 2.5.2. Composição

**Ingredientes Obrigatórios:** leite e ou derivados lácteos e ou outras gorduras comestíveis, outras matérias primas alimentares nos quais os teores de gordura e ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea

**Ingredientes Opcionais:** Leite, seus constituintes e ou derivados lácteos (gorduras, proteínas) frescos, concentrados, em pó, fermentados, reconstituídos ou "recombinados"; outras gorduras e óleos comestíveis; outras proteínas comestíveis; água potável; açúcares; frutas e produtos de frutas; cacau em pó e produtos de cacau; ovos e seus derivados e outras substâncias alimentícias que não descaracterizem o produto.

## 2.6 - Ingredientes utilizados no sorvete e suas funções

Os ingredientes básicos do sorvete podem ser agrupados em produtos lácteos e não lácteos. Os componentes lácteos, juntamente com a gordura, são os mais importantes, porque desempenham importante papel sensorial e funcional nos sorvetes (Viotto apud KATO, 2002).

A melhor composição do sorvete é muito difícil de ser estabelecida, pois esta varia de acordo com o público alvo e com a regionalidade. A seleção de ingredientes excelentes e a manipulação adequada são os fatores de maior importância no processamento bem sucedido de qualquer alimento, garantindo-lhe sabor limpo, fresco e palatabilidade adequada (KATO, 2002).

Os Sólidos Não Gordurosos do Leite (SNGL) contribuem para o sabor lácteo, corpo, mastigabilidade e textura, além da capacidade de formação das células de ar. Os açúcares, além de conferirem sabor doce, são determinantes para o ponto de congelamento, textura e palatabilidade. Embora cada um dos ingredientes mencionados atue de forma muito importante na formulação, dependendo da fonte que são obtidos e do processo de fabricação, podem perder parcialmente sua funcionalidade e por isso utilizam-se outros ingredientes para compensar esta perda ou até mesmo melhorar os atributos do produto original (KATO, 2002).

### 2.6.1. Leite em Pó Integral

Este ingrediente é o responsável pelo fornecimento do sabor lácteo através dos Sólidos Não Gordurosos do Leite. O quadro a seguir apresenta a composição do leite em pó integral:

**Quadro 2. Composição do leite em pó integral (g/ 100g)**

<b>Especificação</b>	<b>Leite em pó Integral (g/100g)</b>
Matéria Gorda	26
Proteína	27 - 29
Lactose	35 -37
Minerais	7 – 8
Umidade	2 – 3
Extrato Seco Desengordurado	71 - 72

Fonte: Kilara,

1997

Os sólidos não-gordurosos do leite (SNGL) consistem em proteínas (37%), lactose (52%) e minerais (9%), obtidos no leite em pó desnatado. No entanto, um excesso de SNGL pode proporcionar um gosto salgado (minerais), queimado ou de

leite condensado e aumentar o risco de cristalização da lactose durante o armazenamento (GUELPH, 1999). A presença de SNGL aumenta a viscosidade e a resistência ao derretimento, porém abaixa o ponto de congelamento (MARSHALL et al., 2000).

### 2.6.2. Gorduras

Óleos e gorduras são formados por moléculas de triacilglicerol resultantes da condensação de uma molécula de glicerol com três moléculas de ácidos graxos. Os ácidos graxos mais comumente encontrados nos óleos e gorduras apresentam cadeias de 16 e 18 átomos de carbono. Essas cadeias podem ser saturadas (sem duplas ligações) ou insaturadas (com ligações duplas). Estas podem ser mono, di ou tri-insaturadas, dependendo da quantidade de duplas ligações carbono/carbono. Óleos e gorduras são substâncias que estão presentes nos alimentos e que apresentam propriedades físicas e químicas características. A diferença entre óleos e gorduras resume-se basicamente na aparência física. A resolução 248/2005 da ANVISA do CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) define a temperatura de 25°C como limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo todos os lipídeos de ponto de fusão inferior à essa temperatura. Através da hidrogenação parcial dos óleos, que consiste na adição de hidrogênio nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, ocorre a saturação, modificando seu ponto de fusão, aumentando sua consistência e dando maior estabilidade oxidativa à gordura obtida. Além disso, o conteúdo de gordura no sorvete também determina a sensação de cremosidade, de frio e brilho, assim como a capacidade de retenção de ar (overrun) (KATO, 2002).

A gordura vegetal substituindo a gordura láctea, reduz os custos e auxilia a textura do sorvete resultante tornando-o mais fácil de ajustar-se às demandas especificadas, possibilitando o aumento da produção. Outra vantagem das gorduras vegetais sobre as lácteas é que aquelas permitem equilibrar o conteúdo de gorduras saturadas e poli-insaturadas da composição. A gordura vegetal hidrogenada veio substituir gordura láctea pelos motivos já citados e por ser substituta deve apresentar características similares à manteiga de leite. Entretanto, nem toda gordura vegetal tem aplicação na indústria de sorvetes, pois esta deve possuir características específicas para essa finalidade (KATO, 2002).

A gordura aplicada no sorvete deverá ser líquida a quente (45°C) e sólida a frio (2°C), ser resistente ao derretimento e com propriedade de cristalizar-se rapidamente. O teor de gordura em sorvetes pode variar de 2 a 16% (Gonçalves apud KATO, 2002). Produtos com alto teor de gordura reduzem a percepção de frio no sorvete, possuem alta sensação lubrificante na boca e são macios e cremosos. A quantidade de gordura a ser cristalizada na fase oleosa é importante, pois reflete no comportamento do produto ao longo do congelamento e a formação da micro-estrutura, favorecendo a formação de cristais de gelo mais finos, proporcionando menores problemas de conservação. Uma vez que a gordura cumpre diversas funções no sorvete, são várias as propriedades desejáveis (Gonçalves apud KATO, 2002).

O quadro abaixo correlaciona o tipo de sorvete com seu respectivo teor de gordura, segundo MARSHALL et al, 2000.

**Quadro 3. Classificação dos sorvetes segundo seu teor de gordura.**

Tipo de Sorvete	Teor de gordura (g/ 100g)
-----------------	---------------------------

Sherbet	2 a 4, base água
Regular	6 a 10
Premium	10 a 16
Super Premium	Acima de 16

Fonte: MARSHALL et al, 2000.

A textura de um sorvete depende de sua estrutura, sendo muito importante o comportamento da gordura durante a estabilização, o congelamento e a aeração. Os cristais de gordura, quando bem homogeneizados, permitem incorporar células de ar desejáveis durante o batimento (overrun), mantendo uma textura suave. Dada essa exposição dos glóbulos de gordura, com as células de ar, a primeira fica sujeita à oxidação e às alterações de paladar. Para tanto, algumas gorduras são adicionadas de anti-oxidantes que dificultam ao máximo esse processo.

As gorduras contribuem para a resistência à fusão do sorvete, promovem maciez e corpo e têm a propriedade de absorver e fixar aromas. (Silva apud KATO, 2002).

### 2.6.3. Açúcares

Os açúcares constituem uma das fontes mais econômicas de energia e de sólidos, cremosidade do produto e intensificação do sabor das frutas adicionadas. Estes carboidratos, ao formarem solução com a água contribuem para a redução do ponto de congelamento da mistura (sem estes, a água apresenta textura similar a um bloco de gelo). Sua presença contribui para o aumento da viscosidade, do tempo de batimento da mistura e da suavidade de textura, tendem a aumentar a taxa de derretimento, além de influenciar no tamanho do cristal de lactose no produto (MOSQUIM, 1999).

O efeito no ponto de congelamento será inversamente proporcional ao peso molecular. Os açúcares dissolvidos abaixam o ponto de congelamento da mistura e reduzem a sua capacidade de batimento. À medida que essas substâncias aumentam a concentração, há menos água na quais os componentes solúveis podem ser dissolvidos, de maneira que o ponto de congelamento será diminuído (MARSHALL & ARBUCKLE, 2000).

Os açúcares que podem estar presentes em sobremesas geladas incluem a sacarose, lactose, maltose, frutose e xaropes de milho (KILARA, 1997). No quadro 4. encontram-se os valores dos adoçantes e agentes de corpo utilizados nas sobremesas geladas (KATO, 2002).

**Quadro 4. Adoçantes e agentes de corpo utilizados em sobremesas geladas.**

Ingrediente	Peso molecular médio <sup>a</sup>	Doçura relativa <sup>b</sup>	Sólidos Totais (g/100g)	Depressão relativa P.C. <sup>c</sup> (°C)
Dextrose	180	74	92	1,90
Frutose	180	173	100	1,90
Sacarose	342	100	100	1,00
Lactose	342	16	100	1,00
Maltose	342	32	100	1,00
Açúcar invertido	360	95	77	1,12

Maltodextrina 10DE	1800	11	95	0,19
--------------------	------	----	----	------

Fonte:KATO,

2002.

<sup>a</sup> O peso molecular médio da maltodextrina é estimado dividindo o peso molecular médio do amido, 18000, pelo fator de dextrose equivalente (DE).

<sup>b</sup> Doçura relativa da sacarose (aproximada ) na base do produto ou no estado.

<sup>c</sup> Fator para estimar o abaixamento do ponto de congelamento relativo aos sólidos iguais à sacarose.

### A. Sacarose

É um dissacarídeo composto de glicose e frutose, quimicamente ligada como açúcar não redutor. A sacarose é considerada o açúcar padrão em sorvetes e muitos outros alimentos. Fornece “corpo” e “sensação tátil bucal”, aumentando a viscosidade do produto (Cândido et al. apud KATO, 2002).

A adição da sacarose provoca a diminuição do ponto de congelamento, afetando a velocidade de formação e o tamanho dos cristais. A cada 1% de aumento da sacarose na mistura de um sorvete, o ponto de congelamento da última reduz em aproximadamente 0,36 ° C (MARSHALL & ARBUCKLE, 2000).

No congelamento do sorvete, a cristalização da sacarose pode afetar a textura e a sensação tátil bucal (fenômeno que pode ser inibido pela adição de xarope de glicose ao produto). A sacarose também aumenta a temperatura de desnaturação da proteína. Em sorvetes, a utilização em níveis de aproximadamente 15% permite a obtenção de bons resultados com relação à intensidade de doçura. Entretanto, este valor depende muito das características regionais e do sabor do sorvete a ser fabricado. Por exemplo, sorvetes de chocolate e frutas requerem uma maior concentração de sacarose (KILARA, 1997).

### B. Lactose

A lactose é um açúcar redutor composto de glicose e galactose (açúcar do leite). A doçura da lactose a 1% é somente 0,15 - 0,20 vezes a da sacarose. Em sorvetes, a lactose mostra efeito sinérgico com a galactose e a glicose. Conferem “flavor”, sensação tátil bucal e viscosidade a vários alimentos. Devido a sua baixa solubilidade, em altas concentrações, pode resultar em cristalização durante a estocagem prolongada. A cristalização da lactose e a formação de cristais com tamanho acima de 10 mm são responsáveis pela arenosidade em sorvetes. Apresenta o mesmo tamanho da glicose e, portanto, possui o mesmo efeito sobre a depressão no ponto de congelamento. Estabiliza proteínas em produtos espumantes, sendo essencial para a estabilidade do complexo de caseinato. Em sobremesas geladas é usualmente empregada em níveis de 1,5 – 7,0 % (KILARA, 1997).

### C. Dextrose (Glucose)

Dextrose é uma hexose obtida por hidrólise completa do amido na presença de ácido diluído e aquecimento. Possui doçura aproximada de 0,75 –0,80 vezes a da sacarose. Portanto, são necessárias 1,25 partes de dextrose para substituir uma parte de sacarose ( KATO, 2002)

Esta hexose diminui o ponto de congelamento duas vezes mais do que a sacarose numa relação peso a peso, isto porque seu peso molecular é aproximadamente a metade do peso da sacarose. Este efeito no ponto de congelamento limita em aproximadamente 25% do total de açúcar a quantidade de dextrose que pode ser usada no sorvete (MARSHALL & ARBUCKLE, 2000).

#### **D. Maltodextrina**

A FDA define maltodextrinas como polímeros não doces de açúcares que consistem de unidades de D-glucose ligadas primariamente por ligações  $\alpha$  1,4; tendo D.E. inferior a 20. O termo D.E. (equivalente de dextrose) é uma medida do conteúdo de açúcares redutores, expresso como glucose. À medida que aumenta o D.E. aumenta a depressão do ponto de congelamento (Cândido et al. apud KATO, 2002).

Os xaropes de milho ou maltodextrinas são freqüentemente adicionados às formulações de sorvete. Estes produtos são menos doces que a sacarose, contribuindo para os sólidos totais e a viscosidade da mistura. Entre suas funções pode-se destacar (KILARA, 1997):

- Controle do ponto de congelamento;
- Contribui para a mastigabilidade, corpo, sensação tátil bucal, proteção contra o desenvolvimento de textura grosseira no sorvete durante a estocagem;
- Fornece proteção contra choque térmico (aumento de sólidos totais);
- Fornece melhores características de derretimento, isto é, apresenta capacidade de retardar o derretimento;
- Inibe a cristalização da sacarose, lactose e outros açúcares;
- Fornece um balanceamento da doçura.

Os xaropes de milho são importantes em misturas de baixo teor de gorduras, sherbets e picolés; e na redução dos custos da formulação. Geralmente, não mais de 25-35% dos açúcares totais são fornecidos pelos sólidos do xarope de milho (MARSHALL & ARBUCKLE, 2000)

#### **2.6.4. Emulsificante**

Uma emulsão é uma dispersão de uma substância imiscível em outra. Os produtos que têm a capacidade de reduzir esta tensão interfacial, facilitando assim a formação de uma emulsão são chamados de emulsificantes. Como resultado da diminuição da tensão interfacial, o ar pode distribuir-se uniformemente no sorvete, favorecendo a capacidade de batimento. O principal efeito dos emulsificantes em sorvetes é a sua capacidade de desestabilizar a membrana dos glóbulos de gordura (KATO, 2002).

Os monos e diglicerídios de ácidos graxos comestíveis e os polisorbatos possuem importância prática para os sorvetes. Os monoglicerídios são emulsificantes de baixo valor HLB (balanço entre as porções hidrofílicas e lipofílicas), unem-se com mais força à fase gordurosa do que à água. Os polisorbatos são emulsificantes óleo em água com elevado valor HLB (11 a 20), desestabilizam a gordura na produtora durante o processo de fabricação de sorvetes mais intensamente do que os monoglicerídios e o produto adquire uma consistência cremosa (KATO, 2002).

As principais funções dos emulsificantes em gelados são resumidas a seguir (Danisco apud KATO, 2002):

- Melhorar a dispersão de gordura;
- Controlar a aglomeração de glóbulos de gordura e a coalescência de gordura livre;
- Auxiliar no batimento ou na incorporação de ar;
- Conferir uma textura e consistência mais fina e suave;
- Aumentar a resistência ao encolhimento;
- Aumentar a resistência ao derretimento;
- Conferir secura ao produto extrusado.

### 2.6.5. Estabilizantes

Estabilizante é definido pela Portaria N° 540/97 –MS (BRASIL, 1997) como substância que torna possível a manutenção de uma dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis em um alimento.

Quando as temperaturas do produto congelado sobem e descem, os cristais de gelo derretem e depois congelam novamente. Esta flutuação na temperatura provoca alterações indesejáveis na textura. O estabilizante faz exatamente o que seu nome implica, isto é, estabiliza o tamanho dos cristais de gelo contra o crescimento como resultado da flutuação de temperatura, comumente referida como choque térmico, durante a distribuição e estocagem (Tharp apud KATO, 2002).

Há três estágios que envolvem o uso de estabilizantes na tecnologia de sobremesas geladas (Tharp apud KATO, 2002):

▪ No processamento da mistura: onde o principal impacto é sobre a viscosidade e homogeneidade

▪ No congelamento da mistura: onde os estabilizantes desempenham um papel secundário sobre a secura e rigidez (dureza), com menor efeito sobre o tamanho dos cristais.

▪ No produto acabado: onde o seu efeito é maior. Após o início do congelamento, o efeito dos estabilizantes torna-se cada vez maior à medida que a porção não congelada torna-se mais concentrada, como resultado da remoção da água do sistema na forma de gelo.

O estabilizante confere ao sorvete corpo e textura suaves, retardando a formação de cristais de gelo durante as oscilações térmicas, além de dar uniformidade e resistência à fusão. O emprego de estabilizantes em sorvetes oferece as seguintes vantagens (KATO, 2002):

- Aumentar a viscosidade da mistura;
- Melhorar a incorporação de ar e a distribuição das células de ar;
- Melhorar o corpo e a textura;
- Melhorar a estabilidade durante o armazenamento;
- Melhorar as propriedades de fusão ou derretimento.

Os hidrocolóides e outros ingredientes controladores de água que funcionam como crioprotetores em emulsões congeladas incluem: alginatos, CMC, carragenas, pectinas, gomas ou sementes (*locuste, bean*), amidos, gelatinas, goma xantana. Muitos produtores de sorvetes utilizam mistura de vários colóides para encontrar a funcionalidade que não pode ser fornecida por um simples ingrediente, por exemplo, combinações de goma xantana com locuste ou guar, carragena e locuste e alginatos e pectinas (Tharp apud KATO, 2002).

## 2.7. Processo de Fabricação

### 2.7.1. Preparo da Mistura

O processamento inicia-se com o cálculo da quantidade de ingredientes necessários. A seleção dos ingredientes está diretamente relacionada a fatores econômicos e disponibilidade (KILARA, 1997). Na figura 2 encontra-se o fluxograma de uma operação de processamento de sorvete.

As misturas de sorvete são emulsões de óleo em água e como tais devem ser preparadas de modo a garantir a melhor estabilidade possível. Como os ingredientes possuem características totalmente diferentes em estado físico, tamanho de

partículas, grau de solubilidade, existe uma ordem de adição sistemática para produzir o melhor efeito (BACCARIN, 1982). Todos os ingredientes líquidos (leite, creme, leite concentrado, xarope, etc.) são colocados na cuba, em seguida a agitação e o aquecimento são iniciados e, então, os ingredientes lácteos sólidos (leite em pó, soro de leite, concentrado protéico de soro). Os outros ingredientes sólidos tais como gema de ovo em pó, cacau em pó, estabilizante e emulsificante devem ser previamente misturados ao açúcar para facilitar sua dissolução. Só então os demais ingredientes (restante do açúcar, xarope de milho e gordura) devem ser adicionados (Costa apud KATO, 2002).

A correta suspensão para evitar a formação de grumos dos ingredientes secos pode ser obtida mediante mistura dos ingredientes secos com parte do açúcar antes de adicioná-los ao líquido, ou peneirando-os lentamente dentro do líquido. O líquido deve estar frio ( $< 30^{\circ} \text{C}$ ) quando o leite em pó desnatado, cacau ou ingredientes similares forem adicionados. As instruções do fabricante devem ser observadas na adição de combinações de estabilizante/ emulsificante na mistura. Algumas combinações podem dissolver a temperaturas relativamente baixas, enquanto outras não devem ser adicionadas à mistura até a temperatura atingir cerca de  $65^{\circ} \text{C}$  (MARSHALL & ARBUCKLE, 2000).

### **2.7.2. Homogeneização**

Na mistura de sorvete existe certa viscosidade resultante das substâncias dissolvidas na água, como açúcares e sais, moléculas protéicas em dispersão coloidal, e dos estabilizantes e emulsificantes adicionados. No entanto, essa viscosidade não é suficiente para impedir a separação superficial das partículas de gordura dispersas no agitador, sendo conveniente a homogeneização da mistura antes de prosseguir o tratamento da mistura de sorvete (KATO, 2002).

A homogeneização reduz os diâmetros dos glóbulos em aproximadamente dez vezes e aumenta a superfície total aproximadamente 100 vezes (KATO, 2002). Os glóbulos de gordura naturais estão revestidos com fosfolipídeos nos quais são absorvidos outros lipídeos e proteínas. Na medida em que os glóbulos de gordura são reduzidos no seu tamanho, cada novo glóbulo deve ser estabilizado, prevenindo a coalescência. Dessa forma, a quantidade de fosfolipídeo disponível à adsorção se torna limitativa e os emulsificantes são adsorvidos (KATO, 2002). A homogeneização melhora a suavidade do sorvete e permite que mais proteínas cubram a superfície dos glóbulos de gordura, evitando sua separação na produtora, o que aumenta a viscosidade da calda, produzindo um corpo mais suave e melhorando a textura no sorvete congelado.

Um excesso de pressão de homogeneização reduz os glóbulos de gordura de tal modo que a quantidade natural de fosfolipídeos disponível se torna insuficiente para cobrir a superfície aumentada dos glóbulos de gordura. Neste caso, os glóbulos podem aglutinar-se, formando glóbulos mais longos ou um amontoado de glóbulos (instabilidade na emulsão água-gordura) que têm o mesmo efeito dos glóbulos maiores, podendo resultar em reversão parcial da fase durante o congelamento. Esta reversão é revelada como desnatação ou engorduramento do cilindro na produtora e das lâminas de raspagem, afetando o corpo e a textura do sorvete acabado (KATO, 2002).

A homogeneização ocorre somente quando a gordura está líquida, visando uma melhor eficiência de homogeneização, a mistura é, então, homogeneizada sob a temperatura de 50°C ou mais (KATO, 2002).

### **2.7.3 Pasteurização**

A pasteurização é o ponto de controle biológico do sistema, com a finalidade destruir as bactérias patogênicas. Este tratamento térmico também reduz o número de microrganismos deteriorantes e a maioria das enzimas hidrolíticas que podem danificar o sabor e a textura; ajuda a dissolver e/ou a hidratar alguns dos componentes (proteínas, gordura, estabilizantes) e melhora a uniformidade do produto (KATO, 2002).

Os gelados comestíveis e os preparados para gelados comestíveis, de acordo com a Portaria Nº 379/99- Secretaria de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde (BRASIL,1999) elaborados com produtos de laticínios ou ovos devem passar, obrigatoriamente, por tratamento térmico nas seguintes condições mínimas:

- Processo contínuo: 80° C por 25 segundos; ou;
- Processo “batch” : a 70° C por 30 minutos; ou;
- Condições equivalentes (de tempo/ temperatura) com poder de destruição de microrganismos patogênicos.

A gordura é um dos ingredientes mais estáveis ao calor, que somente se decompõe em ácidos graxos livres após severo aquecimento em valores de pH ácidos ou alcalinos. Essas condições não existem em uma mistura para sorvetes (KATO, 2002).

As caseínas são muito estáveis ao calor, mas são muito sensíveis a condições ácidas. A sua precipitação nos produtos lácteos fermentados é um exemplo. As proteínas do soro são sensíveis ao calor mas são estáveis ao pH.

No tratamento térmico em batelada (lenta) a 80°- 85° C por 20-40 minutos, a desnaturação das proteínas do soro é quase completa, resultando no aumento da viscosidade da mistura e fornecendo corpo ao produto final. Entretanto, o tratamento térmico não deve ser intenso, evitando o fornecimento de sabor de “cozido” ao sorvete causado pela liberação de componentes sulfúricos a partir da caseína e proteínas do soro (KATO, 2002).

Os carboidratos normalmente não são afetados por tratamentos térmicos padrões contínuos. No caso de pasteurização do sorvete por batelada, normalmente ocorre reação de Maillard, fornecendo ao produto final um sabor de caramelo e coloração marrom (KATO, 2002).

### **2.7.4. Maturação**

Na pasteurização e homogeneização, as misturas são resfriadas a 4°C e mantidas em um tanque até serem transferidas à produtora. Este processo é denominado maturação. A maturação previne o desenvolvimento de microrganismos, promove a cristalização da gordura, a adsorção de proteínas e emulsificantes nos glóbulos de gordura, e a hidratação das proteínas e estabilizantes. Uma melhor qualidade dos sorvetes e do congelamento é mais pronunciada quando a maturação dura de 4 a 12 horas ou mais (Kilara apud KATO, 2002 ).

Nesta fase é complementada a adição dos ingredientes sensíveis ao tratamento térmico, como sucos de frutas, polpas, néctares, óleos essenciais, outros aromatizantes e corantes.

### 2.7.5. Adição de Microrganismos Probióticos

Os microrganismos probióticos utilizados são adicionados refrigerados à massa de sorvete após a maturação da mesma, na etapa de aeração e congelamento parcial em ordem para se detectar aproximadamente  $10^7$  ufc/ g (ALAMPRESE et al, 2002).

### 2.7.6. Aeração e Congelamento Parcial

A mistura, após a maturação, é transferida para a produtora, onde é produzido o sorvete. A produtora tem a função de resfriar rapidamente (1-2 minutos) a mistura de sorvete de 4°C até aproximadamente - 5°C. Nesta etapa, a viscosidade decresce à medida que a agitação rápida quebra a estrutura de gel e destrói os grumos de glóbulos de gordura, além de produzir a incorporação de ar (KATO, 2002).

A incorporação de ar é conhecida pelo nome de “overrun”. O “overrun” se define como o volume de sorvete obtido em excesso em relação ao volume de mistura. Nos processamentos do experimento o valor médio de ar incorporado é 75%.

$$\% \text{ Overrun} = \frac{\text{Volume de Sorvete} - \text{Volume da Mistura}}{\text{Volume da Mistura}} \times 100$$

Uma textura grossa ou suave dependerá do tamanho dos cristais de gelo formados. O objetivo do congelamento de sorvete é produzir o maior número de cristais de gelo, reduzindo a temperatura da mistura bem abaixo do seu ponto de congelamento. Quanto mais elevado for o ponto de congelamento da mistura, maior será o número de cristais de gelo que irão ser formados no congelador a uma determinada temperatura e mais suave será a textura do sorvete (Marshall apud KATO, 2002).

Um ponto de congelamento (ponto de derretimento) baixo tem como resultado uma quantidade relativamente elevada de gelo derretido à medida que a temperatura aumenta. Cristais de gelo tendem a derreter e desaparecer quando a temperatura do ar se eleva, sendo esta superior à do congelamento. Ao cair novamente, abaixo da temperatura do sorvete, a água do produto recongela-se, formando cristais de \*gelo maiores (KATO, 2002).

A quantidade de água congelada varia de acordo com a temperatura de retirada mássica da produtora (Quadro 5).

#### Quadro 5. Percentagem de água congelada em relação à temperatura de retirada na produtora.

Temperatura (°C)	Água congelada (%)
-2,45	0
-3,01	18

- 3,51	27
- 4,01	36
- 6,01	55
- 7,51	63
-8,30	67
- 9,40	90

Fonte: Costa et al apud KATO, 2002

### 2.7.7. Envase

No envase aproxima-se a apresentação final do produto, propriamente dita. Existe uma infinidade de tipos possíveis de envase, capazes de atender a todas as necessidades do mercado, de acordo com o segmento ao qual o sorvete se destina.

Após o batimento, o sorvete é acondicionado nas embalagens definitivas através de enchimento automático ou manual. Esta operação deve ser realizada sem que haja aumento significativo da temperatura (KATO, 2002).

### 2.7.8. Congelamento Total

Antes do armazenamento e transporte o gelado se endurece em câmara a temperatura de  $- 25^{\circ}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$ . O tempo transcorrido entre o congelamento e endurecimento deve ser o mais breve possível, evitando o aumento de temperatura, que causará fusão parcial e posterior formação de grandes cristais de gelo no sorvete durante o armazenamento (Fuingraíño apud KATO, 2002).

O tempo de endurecimento é de 24 horas, sendo este dependente do tamanho e formato da embalagem, da velocidade e temperatura do ar de resfriamento, da composição da mistura e do “overrun” do produto. O produto aerado torna-se mal condutor de calor, do mesmo modo que o material de embalagem dificulta ainda mais o endurecimento do produto (Mosquim apud KATO, 2002).

### 2.7.9. Estocagem

As câmaras de estocagem para sorvetes devem operar em temperaturas de  $- 30^{\circ}\text{C}$  com mínimas flutuações térmicas (BACCARIN, 1982).

### 2.7.10. Distribuição

O sorvete é transportado e armazenado nos pontos de venda ou distribuição em caminhões e câmaras frigoríficas que possuem equipamento de frio para manutenção da temperatura entre  $-20^{\circ}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

## 2.8. Injúria Microbiana pelo Congelamento

Em processamento tecnológico com temperaturas negativas a microbiota resistente no alimento torna-se injuriada e no caso, as *Escherichia coli* associam-se, o

que é normalmente mencionado como fase estacionária. Evidentemente, estado de não diferenciação, significantes mudanças fisiológicas estão acontecendo, que possibilita as células sobreviverem a uma ampla variação de estresse do meio, incluindo radiação direta UV, peróxido de hidrogênio, aquecimento e alta concentração salina. Todas repostas adaptativas requerem mudanças nutritivas ou estresses diferentes, envolvendo uma série de mudanças genéticas que controlam alterações metabólicas (ABEE & WOUTERS, 1999).

Alimentos congelados, refrigerados e minimamente processados, muitas vezes livres de conservantes, induz a adaptação ao frio por microrganismos. O uso destes, muitas vezes livres de conservantes, induz a adaptação microbiana ao frio. Microrganismos de maior interesse em envenenamento alimentar mostram uma ampla variação de temperatura mínima de desenvolvimento, como indicado na tabela 6. O aumento do uso de congelamento como método de preservação é relevante nos últimos anos. As bactérias estão envolvidas em uma rede de adaptações para enfrentar os desafios de mudanças de ambiente e sobreviverem sob condições de estresse (ABEE & WOUTERS, 1999).

**Quadro 6. Microrganismos de interesse alimentar em alimentos minimamente processados**

<b>Temperatura mínima de desenvolvimento</b>	<b>Resistência ao calor baixa<sup>a</sup></b>	<b>Resistência ao calor alta<sup>b</sup></b>
<b>0 - 5° C</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> (INF <sup>c</sup> ) <i>Yersinia enterocolitica</i> (INF) <i>Aeromonas hydrophila</i> (INF)	<i>Clostridium botulinum</i> E e não proteolíticos B (TOX <sup>d</sup> ) <i>Bacillus cereus</i> (INF e TOX) <i>Bacillus subtilis</i> (TOX) <i>Bacillus licheniformes</i> (TOX)
<b>5 - 10° C</b>	<i>Salmonella sp.</i> (INF) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (INF) <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (INF) <i>Staphylococcus aureus</i> (TOX)	
<b>10 - 15° C</b>		<i>Clostridium botulinum</i> A e proteolítico B (TOX) <i>Clostridium perfringens</i> (INF)

<sup>a</sup> Em excesso de 6 inativações log de microrganismos vegetativos por pasteurização, por exemplo temperatura 70° C por 2 minutos.

<sup>b</sup> Em excesso de 6 inativações log de esporos temperaturas superiores a 90° C.

<sup>c</sup> INF, organismos que pode contaminar alimentos, e podem se multiplicar neles, e causam envenenamento alimentar por infecção.

<sup>d</sup> TOX, organismos que podem contaminar alimentos e multiplicarem-se neles para formar toxinas que causam envenenamento alimentar por intoxicação.

Fonte: ABEE & WOUTERS,

1999.

Mecanismos que permitem desenvolvimento a baixa temperatura envolvem modificações na membrana mantendo a fluidez da mesma e manutenção da integridade estrutural das macromoléculas. Uma das melhores reações estudadas para baixa temperatura é a síntese de proteínas abaladas pelo frio, que são responsáveis por estarem envolvidas na síntese protéica e na dobradura do RNA<sub>m</sub> ( Graumann e Marahiel apud ABEE & WOUTERS, 1999).

Uma quantidade considerável de pesquisas está direcionada à resposta bacteriana para uma queda abrupta na temperatura de cultivo, como o acontecido em seu adicionamento à massa de sorvete. Tem sido observado que muitas sínteses bacterianas aumentam a importância de pequenas proteínas (7 kDa) numa repentina queda de temperatura e que são denominadas proteínas abaladas pelo frio (PAF). Essas proteínas apresentam um alto grau de similaridade (>45%) em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo microrganismos relacionados a alimentos, como *Escherichia coli* ( Goldstein et al.,1990), *Bacillus subtilis* ( Willimsky et al., 1992), *Bacillus cereus* ( Mayr et al., 1996), *Salmonella enteritidis* ( Jeffreys et al., 1998), *Salmonella typhimurium* ( CRAIG et al., 1998), *Lactobacillus lactis* ( Wouters et al., 1998), *Lactobacillus plantarum* ( Mayo et al., 1997). Por outro lado, PAF não foram observadas em todas bactérias, por exemplo, *Helicobacter pylori* ( Tombe et al., 1997) e *Campylobacter jejuni* (Hazeleger et al., 1998) (ABEE & WOUTERS, 1999).

Para *Bacillus subtilis*, um tipo de proteínas específicas é induzido no choque frio, o que está envolvido em vários processos celulares, como quimiotaxia, compreensão de açúcar, tradução, dobramento protéico e metabolismo geral. Células de *Listeria monocytogene* induz uma série de 12 proteínas não identificadas no choque frio de 37° a 5° C como observado utilizando-se eletroforese bi-dimensional em gel (ABEE & WOUTERS, 1999).

Este poder de resistência ao congelamento resulta em uma razão de sobrevivência alta de bactérias em produtos alimentares congelados. Além disso, bactéria adaptada à baixa temperatura mostra menor tempo de fase lag em temperaturas frias e sua razão de desenvolvimento em baixas temperaturas são relevantes para a qualidade e segurança do alimento. Grande conhecimento dos mecanismos de adaptação ao frio pode oferecer critério nos métodos de controle de desenvolvimento dos microrganismos psicrotróficos, que se estende ao desafio do prazo de vida útil e da segurança de alimentos refrigerados (ABEE & WOUTERS, 1999).

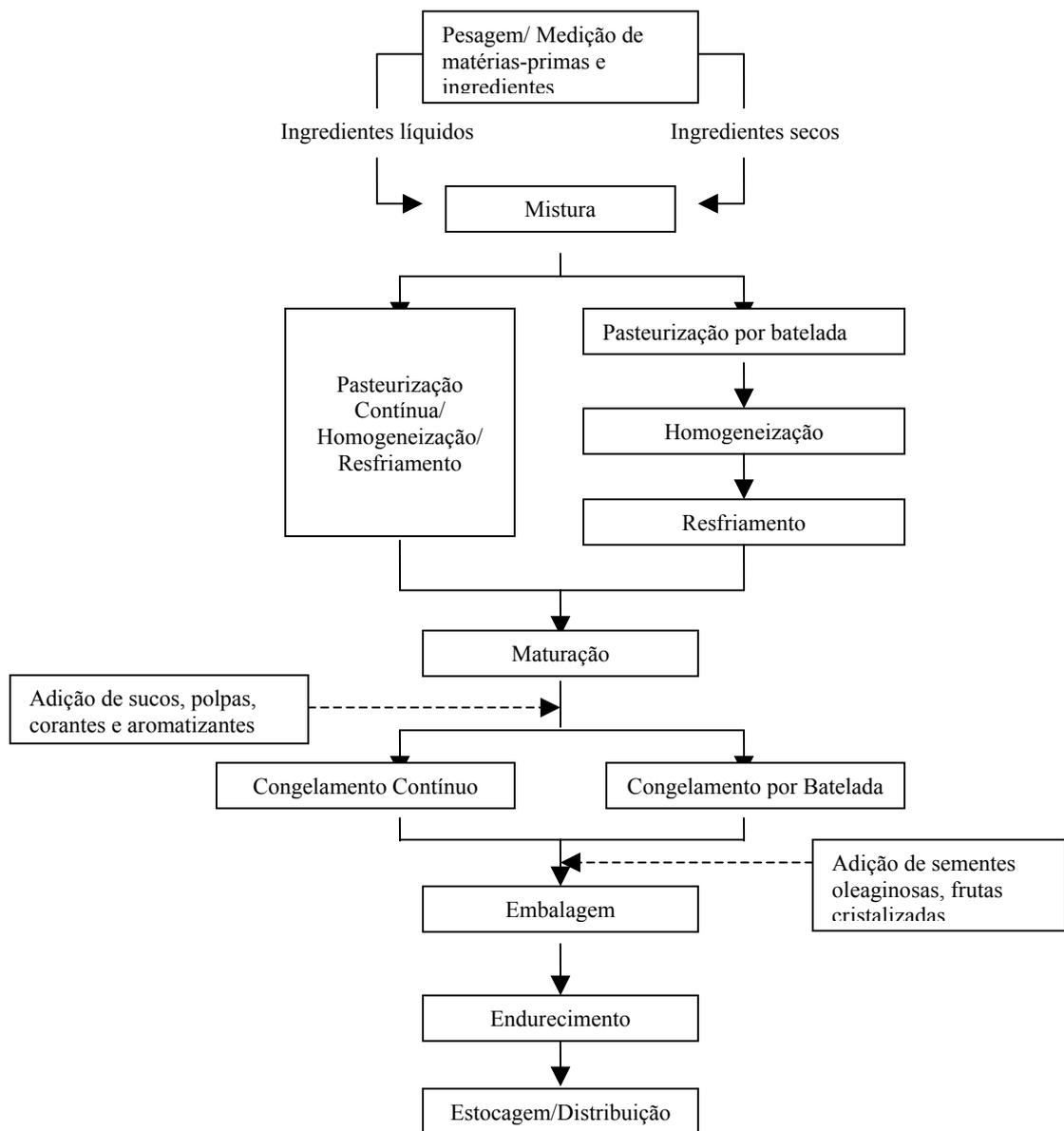


Figura 3. Fluxograma de fabricação de sorvete (KATO, 2002).

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 – Formulação experimental**

A formulação experimental utilizada para este sorvete é proveniente da análise da composição de sorvete de creme regulamentada pela Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999 do Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância Sanitária (BRASIL,1999).

#### **3.2 – Ingredientes e Equipamentos Utilizados**

- Leite em pó integral IMPERATRIZ<sup>0,1,2</sup> e MIL<sup>3</sup>
- açúcar refinado NEVE<sup>1,2</sup> e DOLCE<sup>3</sup>,
- Gordura Vegetal (BUNGE ALIMENTOS)<sup>1,2,3</sup>,
- Dextrose em pó monoidratada – Cerelese 020020 (CORN PRODUCTS)<sup>1,2</sup>, DNA<sup>3</sup>
- Maltodextrina – MOR-REX 1910 (CORN PRODUCTS)<sup>1,2</sup>, PROLÁCTEOS<sup>3</sup>
- mistura comercial de estabilizante/emulsificante - Emustab (DUAS RODAS)<sup>1,2</sup>, GENKOR<sup>3</sup>
- Saborizante Alspice<sup>1</sup>
- Pasteurizador (com emulsor) Mixmatic 110, Tetra Pak Hoyer,
- Balança analítica digital (MICRONAL S. A.)
- Recipientes volumetricos de 10 litros
- Agitador na seção do Emulsor Mixmatic 110, Tetra Pak Hoyer,
- Liquidificador Industrial (SIENSEN, 6000 rpm).
- Máquina produtora (Congelador) - (MODELO DS3, TETRA PAK HOYER),
- Potes de polietileno para 2 litros.
- Câmara de armazenamento a  $-18^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C.
- Destilador
- Autoclave

- Material para isolamento e repique microbiano e análises microbiológicas

<sup>0</sup> – Preparo da Cultura Láctica

<sup>1</sup> – 1º Processamento

<sup>2</sup> – 2º Processamento

<sup>3</sup> – 3º Processamento

### 3.3 - Preparação da cultura probiótica

Os microrganismos do experimento foram provenientes de Leite Fermentado Comercial (LFC). O meio MRS para isolamento de *Lactobacillus* elaborado por MAN et al.1960, foi o utilizado para enriquecimento, cultivo e isolamento dos *Lactobacillus* contidos neste material. Para isso pesou-se 5,5 g de Lactobacilli MRS, seguindo-se pela adição de 100 mL de água destilada, autoclavando a solução à 110°C por 15 minutos. Preparou-se tubos de ensaio de 5 ml de caldo.

Inoculou-se microrganismos de LFC para os tubos descritos anteriormente com 5 mL de caldo MRS. O meio de cultura MRS contém polisorbato, acetato, magnésio e manganês, sendo conhecido agir como fatores especiais de desenvolvimento para *Lactobacillus*, assim como uma base nutritiva rica. Este meio possui um grau muito baixo de seletividade, espécies de *Pediococcus* e *Leuconostoc* e outras bactérias secundárias podem crescer.

Após 24 horas de incubação em estufa a 30°C, os microrganismos do caldo MRS foram isolados em placa de Petri contendo ágar MRS. Após o desenvolvimento de cepas, as mesmas foram coletadas e inoculadas em tubo de 5 mL contendo leite reidratado e, posteriormente, incubadas.

Após 24 horas, a alíquota de 5 mL estava coagulada com *Lactobacillus* isolados de LFC, inoculou-se 5 mL do coágulo anterior em um tubo de ensaio estéril que continha 30 ml de leite reconstituído. A coagulação foi detectada através da desnaturação e/ou precipitação de proteína láctica.

Após 24 horas, retirou-se com o auxílio de uma pipeta 5 mL do coágulo, repetindo-se a operação anterior de inoculação em 30 mL de leite reconstituído. E após a coagulação da alíquota de 30 ml, transferiu-se 5 ml da anterior para erlenmeyers contendo 100 ml de leite.

No 1º processamento preparou-se 5 alíquotas de cultura probiótica, contendo 100 mL de leite reconstituído. No 2º e 3º processamentos, inoculou-se microrganismos de LFC para os tubos descritos anteriormente com 5 ml de caldo MRS, com alça de platina.

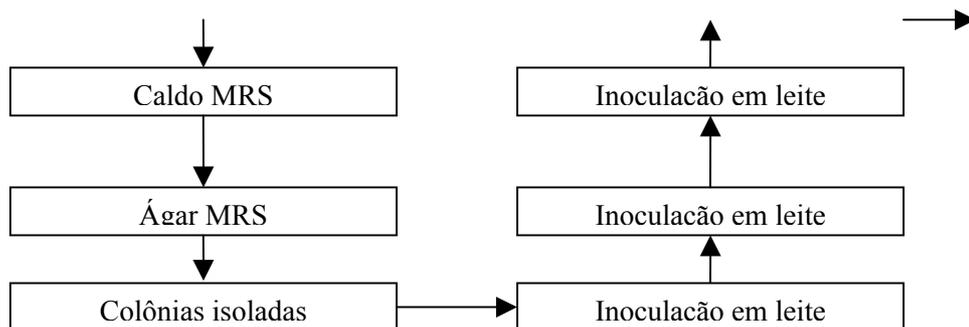
Após 24 horas de incubação a 30°C, realizou-se o isolamento em placa de petri contendo ágar MRS. Após o desenvolvimento, uma colônia foi coletada e inoculada em tubo de 5 ml contendo leite tornassolado.

Após 24 horas a 30°C, através da alça de platina, fez-se o repique do tubo anterior em outro tubo com 5 mL de leite tornassolado. Repetição de operação. Após 24h, transferiu-se 1 ml de cultura repicada em 5 mL de leite tornassolado, para 100 mL de leite reconstituído, incubando-o por 24 horas a temperatura de 30°C. Após 24h de incubação, retirou-se as amostras da estufa, armazenando-as sob refrigeração a 4°C, conforme esquema da figura 3.

LFC

Inoculação em leite

Alíquotas



**Figura 4. Fluxograma do preparo do inóculo de *Lactobacillus* sp.**

O preparo do sorvete foi executada na planta piloto do Centro de Tecnologia de Alimentos e Bebidas do SENAI-RJ, localizado na cidade de Vassouras - RJ. O processo foi realizado por batelada, conforme mostrado no fluxograma da Figura 4.

Utilizou-se o pasteurizador (com emulsor) e a máquina produtora.

O primeiro processamento teve a seguinte formulação: 18% de leite em pó integral, 12% de açúcar refinado, 4,5% de gordura vegetal, 2,5% dextrose, 2% maltodextrina, 1% mistura comercial de estabilizante/emulsificante, 0,02% de saborizante alspice e 30 litros de água, representando 60% da massa de sorvete.

A segunda formulação foi: 18% de leite em pó integral, 12% de açúcar refinado, 4,5% de gordura vegetal 2,5% dextrose, 2% maltodextrina, 1% mistura comercial de estabilizante/emulsificante e 30 litros de água.

O terceiro processamento foi de formulação idêntica ao segundo, porém os ingredientes leite em pó integral, açúcares e mistura comercial de estabilizante/emulsificante foram de produtores diferentes.

O alspice, um ingrediente diferencial, foi preparado com canela, noz moscada e cravo da Índia em pó. A finalidade do uso deste saborizante é de oferecer à massa de sorvete um sabor diferencial, conferindo um sabor picante. Este foi adicionado na etapa preliminar de preparo da calda para a pasteurização uma concentração de 2 g/L de calda de sorvete.

Previamente todos os ingredientes secos foram pesados em balança analítica digital e a água foi medida em recipiente de 10 litros.

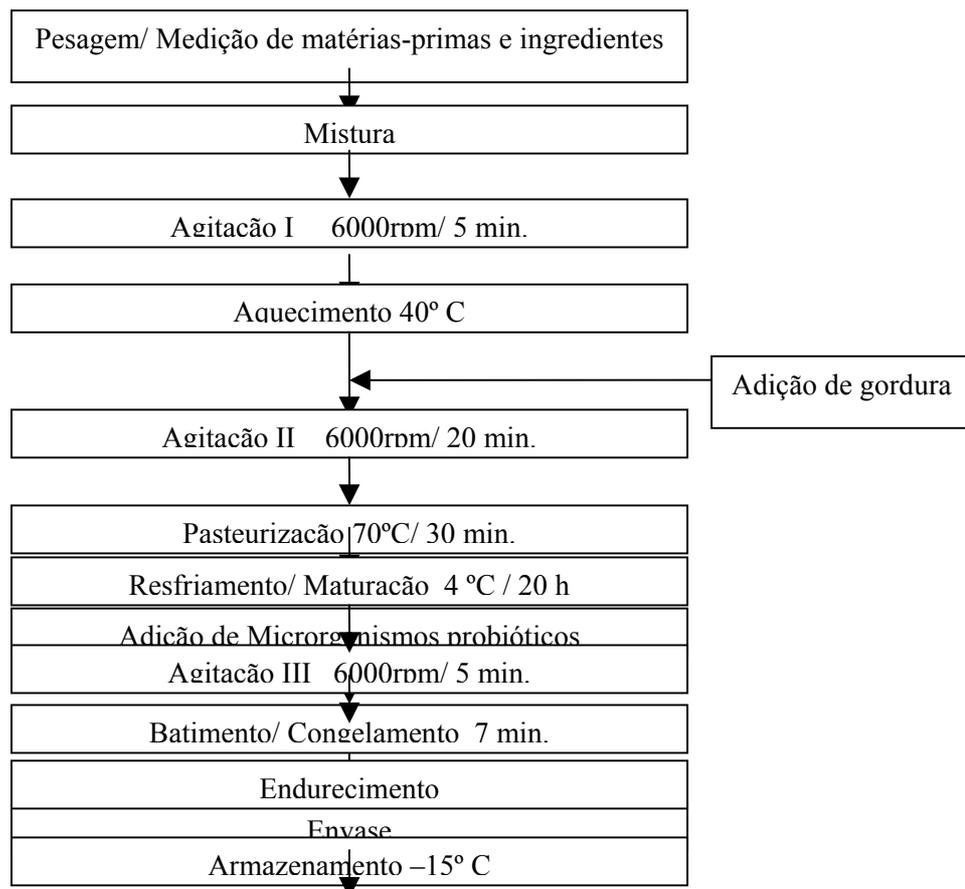
Na preparação da mistura, açúcar refinado, maltodextrina e dextrose foram inicialmente misturados e, então, adicionados à água com leite em pó integral, seguido da adição de emustab e alspice formando uma mistura. Em seguida a mistura anterior foi agitada durante 5 minutos e aquecida até alcançar a temperatura de 40°C. A gordura foi acrescentada à mistura inicial, sendo a calda pasteurizada a 70°C por 30 minutos, seguida de agitação. Depois do tratamento térmico e da homogeneização, a mistura foi resfriada até atingir a temperatura de 4°C e, mantida nesta temperatura na pasteurizadora por 15 horas.

Após a maturação foi realizada a adição da cultura probiótica repicada à 4°C, seguida de homogeneização, em liquidificador industrial com capacidade para 12 litros da calda. Foram coletadas amostras de calda para análises, que foram armazenadas à temperatura de 4°C.

O congelamento parcial foi realizado em uma produtora descontínua, com um tempo de batimento médio de 7 minutos. O sorvete produzido foi embalado em potes de polietileno, com capacidade para 2 litros e imediatamente transferidos para uma câmara de armazenamento a  $-18^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  por 24 horas.

Inóculo foi uma cultura microbiana obtida pelo isolamento e repique de *Lactobacillus* de leite fermentado comercial. As amostras analisadas no experimento foram inóculo, calda e sorvete.

A figura 4 apresenta o fluxograma de processamento do sorvete com a adição do inóculo.



**Figura 5. Fluxograma de processamento do sorvete com microrganismos probióticos**

### 3.5. Análises microbiológicas

#### 3.5.1. Contagem de *Lactobacillus casei* isolada de produto comercial

A amostra de sorvete, que foi descongelada a 4°C por 2 horas, a de calda e a de inóculo da cultura microbiana a 4°C foram diluídas em água peptonada, sendo o material inoculado em cada intervalo de tempo experimental ( 0, 20, 40 dias após processado).

A contagem de microrganismos no 1º experimento; oriundos do isolamento, do repique e de sua adição à calda de sorvete; no inóculo, na calda e no sorvete foi realizada pelo plaqueamento sob profundidade em Ágar MRS, adicionando-se volumes de 1 ml das amostras diluídas a placas de Petri estéreis, acrescentando-se Ágar MRS fundido (45°C), sendo bem homogeneizado. Após solidificação do meio,

adicionou-se agar fundido, formando uma placa em dupla camada. e incubado-a a 30° C.

A razão de sobrevivência microbiana na calda foi a percentagem de células do inóculo resistentes e presentes na calda, a do sorvete foi a quantidade de células da calda, que resistiram à injúria pelo batimento e congelamento, e presentes no sorvete.

No 2º e 3º experimentos a contagem microbiana foi realizada por técnica de microgota. As placas foram incubadas em estufas a 30°C por 48 horas.

### **3.5.2. Teste de Resistência a Sais Biliares**

A determinação de resistência a sais biliares foi realizada pela inoculação da amostra de sorvete diluída em caldo MRS adicionado de 0,3% de bile em caldo MRS como controle, sendo incubada a 30°C.

A absorvância dos cultivos foi determinada por espectrofotômetro (Quick-Lab 2.0) a 540 nm e alíquotas de caldo MRS e de MRS com bile puras zeraram a absorvância do anterior, como referência. As leituras de absorvância no espectrofotômetro foram realizadas nos intervalos de 0, 6, 30 e 48 horas.

### **3.5.3. Teste de Resistência à Acidez**

A determinação da resistência à acidez foi realizada pela inoculação da amostra de sorvete diluída em caldo MRS com ácido clorídrico, pH de 1.3 e incubadas a 30°C. A percentagem de transmitância foi determinada por espectrofotômetro (Quick-Lab 2.0) a 540 nm, alíquotas de caldo MRS ácido zeraram a absorvância do anterior. As leituras foram realizadas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas.

## **3.6. Análises físico-químicas**

### **3.6.1. Determinação da temperatura de arraste**

A temperatura de arraste foi medida no momento em que o sorvete sai da máquina produtora, utilizando-se um termômetro.

### **3.6.2. Determinação do pH:**

O pH do sorvete, à temperatura de 15° C, foi medido utilizando-se pH metro.

## **4. resultados e discussão**

### **4.1 Contagem de *Lactobacillus casei***

### 1º Processamento

A contagem em meio para o cultivo de bactérias lácticas constatou o potencial microbiano do sorvete produzido. Os resultados mostram a quantidade de unidades formadoras de colônia por mililitro de sorvete descongelado a 4°C por 2 horas e da calda de sorvete armazenada sob refrigeração a 4°C por 40 dias.

Analisando o quadro 7 e considerando-se, a utilização de 100 mL de inóculo para cada batelada de 3 L de calda do sorvete, a população viável de *Lactobacillus* sp. no inóculo encontrada foi de  $3,2 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Nota-se um decaimento da quantidade de células viável na calda, como consequência do impacto da calda na viabilidade microbiana e da homogeneização em liquidificador industrial, mantendo-se em  $2,5 \times 10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup>.

A razão de sobrevivência na calda consiste na porcentagem de células do inóculo resistentes e presentes na calda. No processamento foi adicionado à calda uma quantidade de  $3,2 \times 10^{12}$  UFC e detectou-se, em plaqueamento da calda,  $7,75 \times 10^{10}$  UFC. Resultando, em razão de sobrevivência microbiana na calda igual a 2,4 %.

Após a operação anterior, a calda é encaminhada à produtora onde ocorre o congelamento parcial da massa sob bateção, etapa em que ocorre a injúria microbiana pelo congelamento. No sorvete final detectou-se  $1,7 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> de massa fundida de um total de  $2,5 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, como detectado na calda.

A razão de sobrevivência no sorvete foi a quantidade de células da calda, que resistiu à injúria pelo batimento e congelamento, e estava presente no sorvete. Antes da operação de batimento sob baixa temperatura a concentração obtida foi de  $2,5 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, após foi de  $1,7 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A razão de sobrevivência microbiana, no sorvete resultante, é 68% da população de probióticos presentes na calda.

O batimento à temperatura de -7°C provocou uma menor injúria microbiana comparado ao realizado a + 7°C, explicado pelo aumento da porcentagem de água congelada, características crioscópicas de ingrediente do sorvete, redução de fluidez da calda e, conseqüentemente minimização da injúria microbiana decorrente do impacto das células com a superfície de choque (contato).

Após o período de 20 dias de estocagem do sorvete em congelador a temperatura de -18°C e da calda em refrigerador a temperatura de 4°C constatou-se uma concentração de  $3,2 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> no sorvete e  $3,1 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> na calda.

Com 40 dias de armazenamento, a concentração de probióticos na calda de sorvete foi  $9,38 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> e no sorvete foi  $1,15 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

De acordo com o regulamento apresentado pela ANVISA (BRASIL, 2002), produtos contendo probióticos para o consumo humano devem possuir no mínimo  $10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup>.

Pelos resultados obtidos neste experimento, o sorvete enriquecido com microrganismos probióticos deste experimento pode ser armazenado até 44 dias após o processamento a -20°C, intervalo no qual houve uma manutenção de uma população microbiana aceitável para classificá-lo como alimento funcional.

**Quadro 7. Concentração microbiana de *Lactobacillus* no inóculo; na calda e no sorvete após processo e com 20 e 40 dias de armazenagem.**

Tempo (dias)	Inóculo LFC (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Calda LFC (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Sorvete LFC (UFC.mL <sup>-1</sup> )	R.S.*
0	3,20E+10	2,50E+07	1,70E+07	68,00%
20		3,10E+07	3,20E+06	10%
40		9,38E+07	1,15E+06	1%

\*R.S. – Razão de Sobrevivência

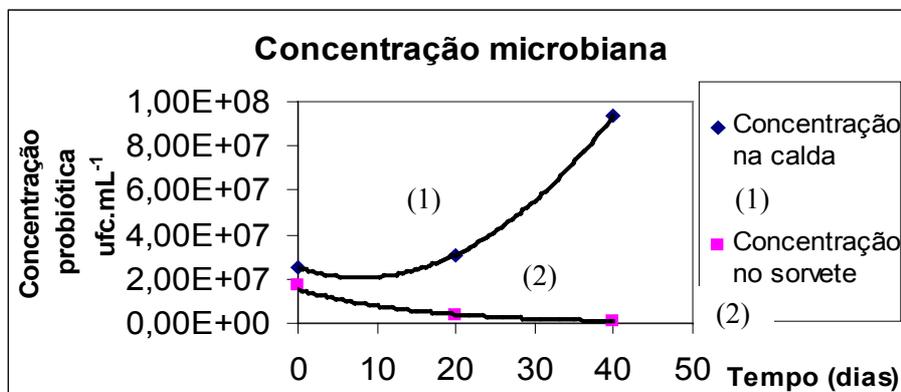


Figura 6. Concentração de microrganismos probióticos na calda e no sorvete nos períodos de 0, 20 e 40 dias.

## 2º Processamento

A razão de sobrevivência deste sorvete consiste na percentagem de células do inóculo resistentes e presentes no produto final. Utilizou-se 100 mL de inóculo para 3 L de calda resultando, após o congelamento parcial e incorporação de ar, em 4,5L de sorvete. Conforme o quadro 8, foi adicionado à calda uma quantidade de  $1 \times 10^{11}$  UFC e detectou-se uma concentração microbiana no sorvete de  $4 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Resultando, em razão de sobrevivência microbiana igual a 18 %.

**Quadro 8. Concentração microbiana de *Lactobacillus* no inóculo, no sorvete após processo, e no anterior com 25 dias de armazenagem.**

Inóculo: $1 \times 10^9$ ufc mL <sup>-1</sup>
Sorvete: $4 \times 10^6$ ufc mL <sup>-1</sup>
Sorvete (25 dias): $7 \times 10^5$ ufc mL <sup>-1</sup>

## 3º Processamento

Conforme o quadro 9, foi adicionado à calda uma quantidade de  $1 \times 10^{11}$  UFC e detectou-se uma concentração microbiana no sorvete de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Resultando, em razão de sobrevivência microbiana igual a 45 %.

**Quadro 9. Concentração microbiana de *Lactobacillus* no inóculo, no sorvete após processo, e no anterior com 25 dias de armazenagem.**

Inóculo: $1 \times 10^9$ UFC mL <sup>-1</sup>
Sorvete: $1 \times 10^7$ UFC mL <sup>-1</sup>
Sorvete (25 dias): $<3 \times 10^1$ UFC mL <sup>-1</sup>

Em artigo de revisão bibliográfica (ALAMPRESE et al., 2002) contendo resultados de concentrações microbianas e de razão de sobrevivência de *Lactobacillus johnsonii* em sorvete formulado com 15% de açúcar e 5% de gordura,

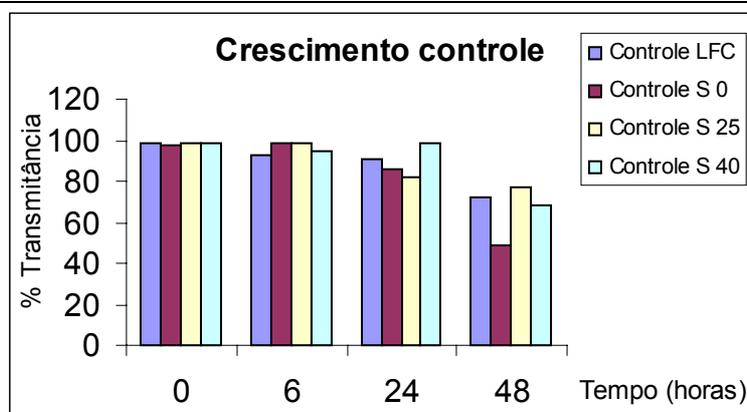
demonstraram uma concentração de probióticos na calda de  $5,3 \times 10^7$  UFC/mL e no sorvete, resultante do batimento desta calda sob congelamento, de  $2,9 \times 10^7$  UFC/mL. A razão de sobrevivência dos microrganismos resultante deste processo é 55%. Na calda com 15% de açúcar e 10% de gordura constatou-se  $4,3 \times 10^7$  UFC/mL e no sorvete  $3,3 \times 10^7$ , resultando numa razão de sobrevivência igual a 77%.

O sorvete do 1º processamento foi de composição semelhante ao do 2º processamento, diferindo-se apenas na presença de saborizante. No 2º processamento alguns ingredientes do sorvete foram diferentes dos mesmos do 3º processamento.

#### 4.2. Crescimento Controle

O controle do crescimento dos microrganismos do experimento foi realizado pela inoculação de inóculo e sorvetes diluídos em caldo MRS, seguido de incubação à temperatura de 30° C. O aparelho espectrofotômetro na análise do inóculo foi zerado com amostra de caldo MRS, nas análises do sorvete foi zerado com as respectivas duplicatas sem probióticos. As leituras de percentagem de transmitância foram realizadas nos períodos de 0, 6, 24 e 48 horas. Quanto menor o valor de transmitância obtida na leitura espectrofotométrica, maior é a concentração microbiana na amostra analisada.

3º processamento	Controle LFC	Controle S 0	Controle S 25	Controle S 40
0h	99	98	99	99
6h	93	98,5	99	94,5
24h	90,5	86	82	98,5
48h	72,5	49	77	68



**Figura 7.** Valores em percentagem de transmitância do inóculo, dos sorvetes após 0, 25 e 40 dias processado em caldo MRS, como controle, obtidas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas.

Verificou-se na fig. 7, o crescimento de lactobacilos de amostras diluídas em caldo MRS, constatando, nas primeiras seis horas, um crescimento maior da cultura do inóculo comparada à do sorvete. Nas leituras de 24 e 48 horas, detecta-se um crescimento maior da do sorvete frente à cultura do inóculo.

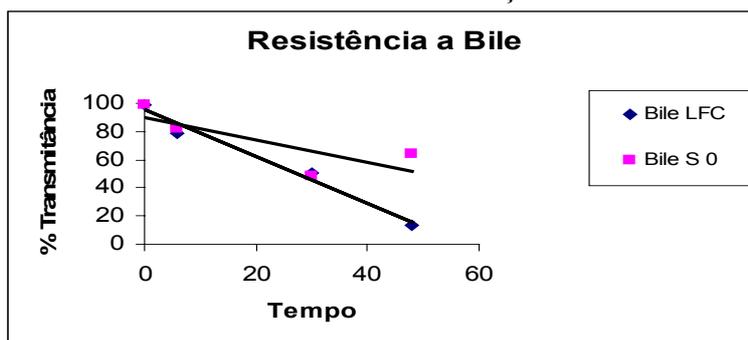
#### 4.3. Resistência a Sais biliares

Resistência à acidez e a sais biliares são características consideráveis na seleção de cultura que poderá ser utilizado como adjunto dietético. Quanto maior a

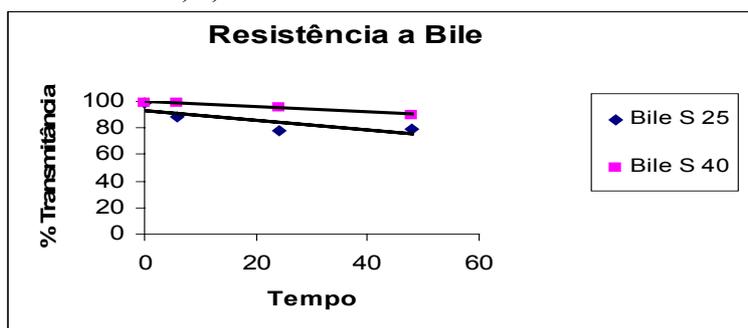
redução de transmitância no decorrer do período de incubação, maior é o desenvolvimento microbiano na amostra, demonstrando maior resistência microbiana. O “stress” celular que ocorre no estômago é decorrente do pH tão baixo quanto 1,5. Depois que as bactérias tiverem passado pelo estômago, estes microrganismos entram no trato intestinal onde é secretado bile dentro do intestino. A concentração de bile no sistema gastrointestinal humano é variável e difícil de ser predito a qualquer momento dado (MARTEAU & HUIS, 1997). Então, a maneira selecionada para ser usada como bactéria probiótica precisa ser capaz de tolerar ácidos e ácidos biliares, para aderirem ao epitélio, e para se desenvolverem na parte baixa do trato intestinal, em ordem para prover benefícios verídicos a saúde humana (CHOU & WEIMER, 1999).

O crescimento de lactobacilos em presença de 0,3%, de sais biliares (Oxoid), detectado por espectrofotômetro com densidade óptica de 540 nm é expresso em percentagem de transmitância, depois de 6, 30 e 48 horas de incubação, nas leituras do inóculo e do sorvete logo após processado, está demonstrado na figura 8. Obteve-se a percentagem de transmitância nos testes dos sorvetes 25 e 40 dias após processado com 6, 24 e 48 horas de incubação a temperatura de 30° C, como está demonstrado na figura 9.

Ao fazer os gráficos adicionou-se a linha de tendência interligando os pontos, detectando sua equação e determinando uma estimativa para o valor da percentagem de transmitância durante as 48 horas de incubação.



**Figura 8.** Valores em percentagem de transmitância da cultura e do sorvete após processado em caldo MRS com 0,3 % de sais biliares obtidas nos intervalos de 0, 6, 30 e 48 horas.

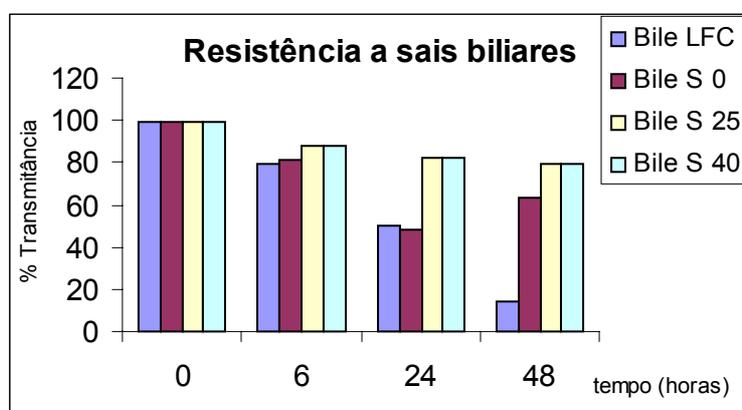


**Figura 9.** Valores em percentagem de transmitância dos sorvetes após 25 e 40 dias processado em caldo MRS com 0,3 % de sais biliares obtidas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas.

Optou-se, diante dos resultados e do resultado da análise do 3° processamento, por se convergir as leituras de cultura e de sorvete após processado diluídos em caldo MRS com 0,3% de bile, realizadas com 30 horas de incubação a 30°C em leituras com 24 horas.

2º Processamento	Bile LFC	Bile S 0	Bile S 25	Bile S 40
0h	99	99	99	99
6h	79	81,5	88	99
24h	55,7	70,7	82	95
48h	14	63,5	79	90

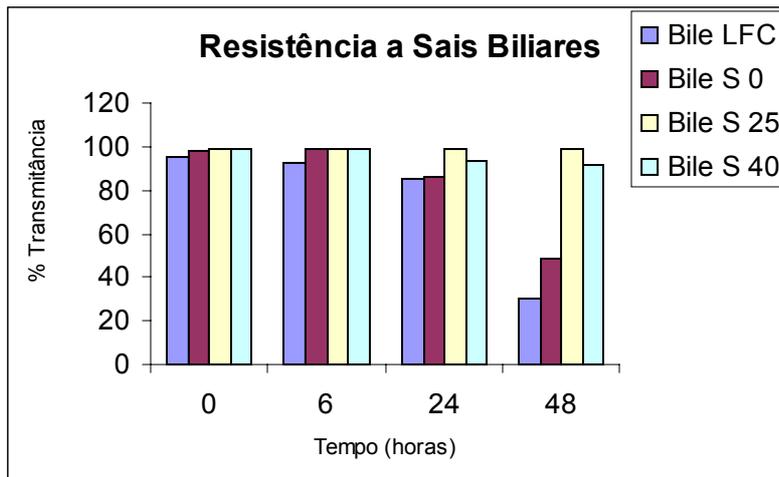
A Fig. 10 demonstra os resultados do teste de resistência a sais biliares do 2º processamento. Uma resistência semelhante é observada pelos microrganismos da cultura láctica frente aos do sorvete nas primeiras 24 horas.. Na leitura de 48 horas uma diferença considerável é observada entre a transmitância do inóculo e a do sorvete após processado. A transmitância é inversamente proporcional à presença microbiana no caldo.



**Figura10.** Valores em porcentagem de transmitância do inóculo, dos sorvetes após 0, 25 e 40 dias processado em caldo MRS com 0,3 % de sais biliares obtidas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas.

3º processamento	Bile LFC	Bile S 0	Bile S 25	Bile S 40
0h	95	98	99	99
6h	92,5	98,5	99	98,5
24h	85	86	99	93,3
48h	30	49	99	92

Na figura 11, 3º processamento, observa-se uma resistência a bile semelhante dos microrganismos do inóculo e do sorvete após processado durante as primeiras 6 horas. Após 24 horas de incubação, uma resistência maior a sais biliares foi observada no teste da cultura do sorvete perante do inóculo. Na leitura de 48 horas de incubação detectou-se um aumento da diferença de transmitância do caldo MRS com 0,3% de bile do inóculo frente ao sorvete após processado

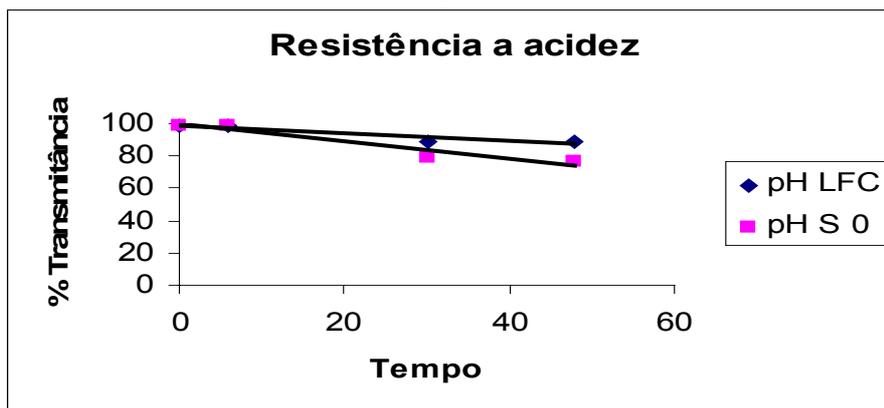


**Figura 11.** Valores em percentagem de transmitância do inóculo, dos sorvetes após 0, 25 e 40 dias processado em caldo MRS com 0,3 % de sais biliares obtidas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas .

#### 4.4. Resistência à acidez

O crescimento de lactobacilos em caldo MRS ácido (pH = 1,3) detectado por espectrofotômetro com densidade óptica de 540 nm e expresso em percentagem de transmitância, depois de 6, 30 e 48 horas de incubação, nas leituras do inóculo e do sorvete logo após processado, está demonstrado na figura 12.

Ao fazer os gráficos traçou-se a reta interligando os pontos, detectando sua equação e determinando uma estimativa para o valor da percentagem de transmitância em caldo MRS ácido do inóculo e dos sorvetes após 0, 25 e 40 dias processado, durante as 48 horas de incubação.



**Figura 12.** Leituras de valores em percentagem de transmitância da cultura e do sorvete após processado em caldo MRS ácido obtidas nos intervalos de 0, 6, 30 e 48 horas.

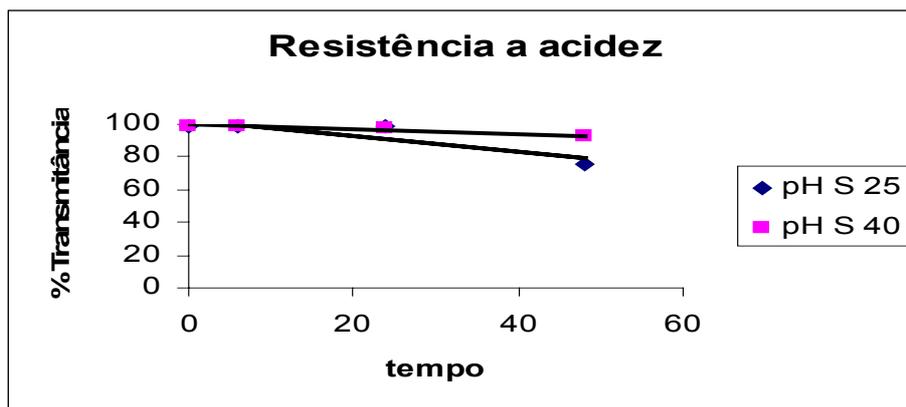


Figura 13. Leituras de valores em porcentagem de transmitância dos sorvetes após 25 e 40 dias processado em caldo MRS ácido, obtidas nos intervalos de 0, 6, 24 e 48 horas.

Determinaram-se os resultados de % de transmitância do inóculo e do sorvete logo após processado em 24 horas de incubação.

2º Processamento	pH LFC	pH S 0	pH S 25	pH S 40
0h	99	99	99	99
6h	99	99	99	99
24h	93	87	99	97
48h	89	77	76	92,7

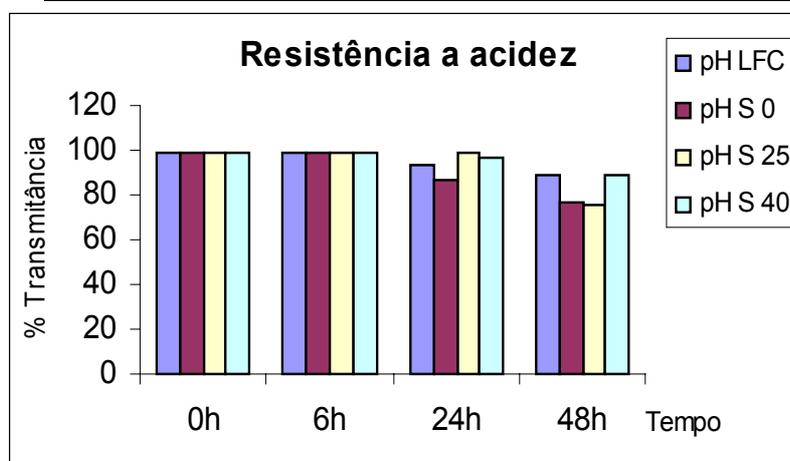


Figura 14. Valores em porcentagem de transmitância em caldo MRS ácido com inóculo e sorvetes 0, 25 e 40 dias processado, sob a temperatura de 30°C em 0, 6, 24, 48 horas.

Nas primeiras 6 horas, observou-se uma etapa estacionária, sem crescimento microbiano. Decorrido o tempo de 24 horas de incubação, nota-se um crescimento maior da cultura do sorvete perante a do inóculo, demonstrando uma resistência maior dos microrganismos do sorvete à acidez. Com 48 horas, um maior crescimento foi observado no teste de amostras de sorvete logo após processado e do mesmo após 25 dias de armazenamento.

Na fig 15., nota-se uma % de transmitância constante de amostra do inóculo, aliado a um crescimento progressivo da cultura nos testes de amostras do sorvete, demonstrando uma resistência a acidez mais destacada dos microrganismos do sorvete frente aos do inóculo.

3º processamento	pH LFC	PH S 0	pH S 25	pH S 40
0h	99	89	99	97,5
6h	99	65	99	99
24h	99	59	97	95,5
48h	99	56	96	91

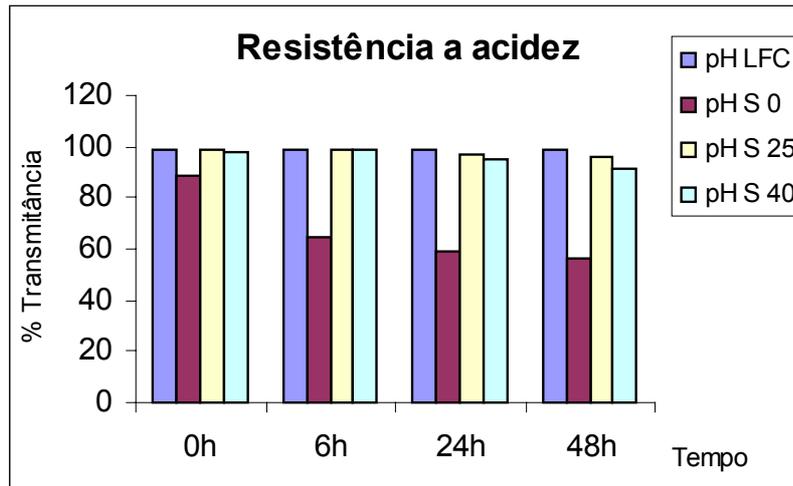


Figura 15. Valores em percentagem de transmitância em caldo MRS ácido com inóculo e sorvetes 0, 25 e 40 dias processado, sob a temperatura de 30°C em 0, 6, 24, 48 horas.

#### 4.5. Temperatura de arraste

##### 1º Processamento

A temperatura de arraste do sorvete enriquecido com microrganismos probióticos foi semelhante ao do não enriquecido e de mesma formulação. A temperatura de saída do sorvete enriquecido com *Lactobacillus casei* foi - 6,4° C.

O quadro 10 mostra os resultados das temperaturas dos sorvetes, no momento em que estão embalados, após saírem da máquina produtora.

Quadro 10. Temperatura de arraste do sorvete enriquecido com probióticos

Sorvete enriquecido	Temperatura de Arraste (°C)
LFC	- 6,8
LFC	- 6,7
LFC	- 6,4
LFC	- 5,7

#### 4.6. pH

##### 1º Processamento

O inóculo utilizado no sorvete com *Lactobacillus* de LFC apresentou um valor de pH igual a 4,56. O sorvete enriquecido com este inóculo apresentou pH igual a 6,71. O sorvete sem o anterior apresentou pH igual a 6,73.

Pela análise dos resultados observou-se um pequeno aumento da acidez do sorvete enriquecido comparado ao mesmo sem inóculo, justificado pela adição de um meio mais ácido à mesma calda de sorvete numa temperatura de 4 °C, onde a atividade metabólica de *Lactobacillus* é baixa, seguido de congelamento.

## **5. Conclusões**

Sorvete com microrganismos probióticos foi produzido utilizando cultura láctica de *Lactobacillus* sp.. O sorvete produzido contém uma concentração adequada destes microrganismos, sendo viável a sua produção. O sorvete pode ser usado como uma boa fonte de incorporação dessas bactérias para o consumidor.

No batimento inicial da calda de sorvete com cultura láctica à temperatura de + 4°C ocorre uma injúria microbiana maior, relacionado ao batimento sob congelamento (etapa posterior) - produtora de sorvete, à temperatura de - 7° C.

Qualquer alteração da composição do sorvete com probióticos decorrente da adição de cultura láctica, pode ser minimizada pela formulação.

Neste experimento comprovou-se a viabilidade da inoculação de Lactobacilos em sorvetes.

## **6. Sugestões para trabalhos futuros**

Resistência microbiana de *Lactobacillus* sp. em alimentos contendo o saborizante do sorvete.

Desenvolvimento do saborizante para alimentos.

## 7. Referências Bibliográficas

ABEE, T. & WOUTERS, J. A. , Microbial stress response in minimal processing . International Journal of Food Microbiology 50 (1999) p. 65- 91.

ALAMPRESE, C., FOSHINO, R., ROSSI, M., POMPEI, C., SAVANI, L., “Survival of *Lactobacillus johnsonii* La 1 and influence of its addition inb retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentration”. International Dairy Journal 12 (2002) p. 201-208

ALMEIDA, A. L. F. et al. Revista Food Ingredients – Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria de Alimentos e Bebidas – nov/dez – 2001 “ Sorvetes – Um mercado sempre pronto para crescer”.

ARBUCKLE, W.S., Ice Cream Third Edition. Departament of Dairy Science, University of Maryland College Park, Maryland, 1977.

BACCARIN, A. Tecnologia da produção de sorvetes. 1982. Dissertação (mestrado em tecnologia bioquímica-farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa SDA N° 22 de 22/04/03, Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de produtos de leite e produtos lácteos, 2003

BRASIL, **Portaria n° 540 – SVS/MS**, de 27 de outubro de 1997. Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 out. 1997.

BRASIL, **Portaria n° 379**, de 26 de abril Regulamento Técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para preparo e bases para gelados comestíveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 abr.1999..

BRASIL. ANVISA/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução n°.2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 jan. 2002.

Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis> Acesso em 17 set.2003.

BRASIL. Resolução RDC n.º 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF.

BRASIL, 2005. ANVISA/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC n° 266, de 22 de setembro de 2005. "REGULAMENTO TÉCNICO PARA GELADOS COMESTÍVEIS E PREPARADOS PARA GELADOS COMESTÍVEIS". Publicada no **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF.

BRASIL, 2005. ANVISA/ ALIMENTOS Resolução RDC nº 248, de 13 de setembro de 2005. “REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE O USO DE COADJUVANTES DE TECNOLOGIA, ESTABELECENDO SUAS FUNÇÕES, PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS - ÓLEOS E GORDURAS, CONSTANTES DO ANEXO DA PRESENTE RESOLUÇÃO” **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, de 14 de setembro de 2005.

COLLINS, M. D. & GIBSON, G. R., Nutritional modulation of microbial ecology. *American Journal of Clinical Nutrition* in press, 1998.

CHOU, L. S., & WEIMER, B., 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82, 23-31.

FERNANDES, C. F., SHAHANI, K. M., AMER, M. A, Control of diarrhea by lactobacilli, *Journal applied Nutrition*, v. 40, n.1, p.32 – 43, 1988

FERREIRA, C. L. L. F, Produtos Lácteos Fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos, Viçosa - MG, UFV, impr. Univers, p.96, 1987

FERREIRA, C. L. L. F. Prebióticos e Probióticos: Atualização e prospecção. Viçosa, MG, 206p, 2003.

FULLER, R.. Probiotics – The scientific basis – University Press, Cambridge – Great Britain. Chapman & Hall, 1992, cap 13, p. 355-376. Probiotics for humans – GOLDIN, B. R. e GORBACH, S. L..

FULLER, R. History and development of probiotics. NeW York: Marcell Dekker, p.1 - 8, 1994.

GILLILAND, S. E, Beneficial interrelationship between certain microorganisms for use as dietary adjuncts, *Journal of Protection* v.42, n.2, p. 164 – 167, 1979

GOLDIN, B. R. Health benefits of probiotics. *Bristish Journal of Nutrition*, v.80, sup.2., p. 203 –207,1998.

GOODMAN,S. – The Evidence for Probiotics. Disponível em < <http://www.positivehealth.com/permit/Articles.htm> >. Acesso em: 21 abril de 2004.

GORBACH, S. L., CHANG, T.,COLDIN, B, Successful treatment relapsing clostridium difficile colite lactobacillus GG, *Lancet*, v.2, n. 8572, p. 15-19, 1987

GUELPH,1999. University of Guelph. Ice cream manufacture. Disponível em: < <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/icmanu.html> >. Acesso em 12 de janeiro de 2004.

HAENEL, H. & BENDING, J., Intestinal flora in health and disease. *Progr. Food. Nutr. Sci.*1, p. 21- 64, 1975.

JGI MICROBES – Disponível em < [http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/lacca/lacca.home.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/lacca/lacca.home.html) >. Acesso em: 1º maio de 2004.

KANDLER, O. & WEISS N., 1986. Genus *Lactobacillus*, pp. 1063-1065. In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

KATO, N.M., Propriedades Tecnológicas de Formulações de Sorvete contendo Concentrado Protéico de Soro (CPS). Dissertação de Mestrado UFRRJ, 2002.

KILARA, Arun. Ingredients. Sugar, corn sweeteners and other sweetening agents. In: *The Penn State Ice Cream Short Course*, Pensilvânia, 1997. cap.2, p. 35-43.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI B.; DEETH, H. “Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt” School of Land and Food Sciences, The University of Queensland, St. Lucia, Australia, 2003

KURMANN, J. A. , Starters for fermented milks, In: *Fermented Milks Science and Technology*, IDF Bulletin 227, IDF, Brussels, pp.41 – 55, 1988

LILLY, D. M. & STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms, *Science*, v.147, p.747 – 748, 1965.

LUCHESE, R.H., Efeitos de condimentos e açúcares no desempenho de culturas lácticas utilizadas na fabricação de salame. Tese de Mestrado. UFV. Viçosa, Impr. Univ., 1987 .

MADLEY, R, Probiotics, prebiotics & simbiotics: harnessing enormous potential, *Nutr. World*, v. 4, n. 9, p. 50 –76, 2001

MANUAL OXOID; 8ª edição 1998 (inglês), 1ª edição 2000 (português), Oxoid Limited.

MARSHALL, R. T. & ARBUCKLE, W. S. *Ice Cream*. 5 ed.: International Thomson Publishing, 2000.

MARTEAU, P., MINEKUS. M., HAVENAAR, R.,& HUIS In't Veld, J.H.J. , 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 80, 1031-1037.

MEISAMI, E.; MACEY, R. I.; KAPIT, W., *The Physiology coloring book*, Harper Collins Publishers, Berkeley, Califórnia, U.S.A., 1987. Digestion p. 69.

MITSUOKA, T. Recent trends in research on intestinal flora, bifidobacteria *Microflora* 1, pp.3 – 24, 1982.

MOSQUIM, M. C. A., *Fabricando sorvetes com qualidade*. São Paulo. Fonte Comunicações e Editora, 1999. 120 p.

O'BRIEN, J., CRITTENDEN, R., OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S. Safety evaluation of probiotics. Trends Food Sci. Technol., Amsterdam, v.10, p.418 – 424, 1999.

O'SULLIVAN, M. G, Probiotic bacteria: Myth or reality? Trends Food Science Technology, v. 3, p. 309 – 314, 1992.

PEDROSO, Antonio Carlos. Sorvetes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA EM SORVETES, 2, 2000, Vassouras-RJ, representante da MAEDA S. A. AGROINDUSTRIAL.

RASIC, J. L & KURMAM, J. A, Bifidobacteria ad their role, Basel: Birkhauser Verlag, p.295, 1983

SABINSA CORPORATION, 2004 Lactic Acid Bacillus, Corporate Office – Disponível em: < [www.lactospore.com](http://www.lactospore.com) > Acesso dia 31 de agosto de 2004

SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. MORELLI, L., MARTEAU, P., BRASSART, D., DE VOS, W. M., FONDÉN, R., SAXELIN, M., COLLINS, K. MOGENSEN, G., BIRKELAND, S. E., MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics: a review. Int. Food. Microbiol. , Amsterdam, v. 4, p. 93 – 106, 1998.

SALMINEN, S., OUWEHAND, A. C. & ISOLAURI, E., Clinical Applications of probiotics bacteria. Int, Dairy J, pp.563 –572, 1998.

SILVA, P. H. F.- Curso Básico sobre Sorveteria EPAMIG/CEPE – Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora.

SOUSA, J. S., Probioticos: O estado das coisas, n.1, vol. 32:p. 25 - 30, Acta Pediátrica Portuguesa, 2001

ZIEMER, C. J. & GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. Int. Dairy. J. Amsterdam, v. 8, p. 473 – 479,1998.

TAMINE, A, Novas tendências na tecnologia de leites fermentados e produtos probióticos. Dairy Science and Techonology, Departamento de Ciências Farmacêuticas- FCF- USP, 2002.



**ANEXOS**

**Anexo I**

COMPOSIÇÃO ( VALORES MÍNIMOS EM PORCENTAGEM, g/100g, DE PRODUTO FINAL )

	1			2			3			4	5	6
	SORVETES DE CREME ( d )			SORVETES DE LEITE			SORVETES			"SHERBETS"	GELADOS DE FRUTAS OU "SORBETS"	GELADOS
SÓLIDOS TOTAIS	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3			
		+ OVO	+ FRUTA (e)		+ OVO	+ FRUTA (e)		+ OVO	+FRUTA (e)	(e)	(e)	
	32	32	30	28	28	26	28	28	26	20	20	10
GORDURA LÁCTEA	3	3	(a) 3	2,5	2,5	(a) 2,5		3	(a) 3	1		
TOTAL DE GORDURAS COMESTÍVEIS	8	8	(a) 7									
PROTEÍNAS DE LEITE	2,5	2,5	(a) 2,5	2,5	2,5	(a) 2,5	2,5	2,5	(a) 2,5	1		
OUTRAS PROT, COMESTÍVEIS												
SÓLIDOS TOTAIS, GEMA DE OVO OU EQUIVALENTE DECLARADO		1,4			1,4			1,4				
SÓLIDOS DE CACAU (c)				3	3		3	3		3		

DENSIDADE APARENTE	475	475	475	475	475	475	475	475	475	475	475	475
g/Litro (b)												

(a) Porcentagem sobre o peso do produto, excluída a fruta.

(b) Densidade aparente é a medida do ar incorporado ao sorvete ( overun ) mediante batimento e é expressa em gramas/litro.

(c) Os Gelados Comestíveis aqui caracterizados serão denominados "de chocolate"

(d) Para efeito desses padrões, a expressão "NATA" equivale a "CREME", limitando o seu uso para os produtos que preenchem as composições indicadas na coluna 1.

(e) Os gelados comestíveis cuja denominação signifique ou dê a entender que contém frutas ou produtos de frutas, deverão ter no mínimo 3% de fruta fresca, polpa, suco ou seu equivalente. Quando o gelado comestível contiver mistura de frutas ou produtos de frutas e o rótulo não mencionar individualmente, o teor mínimo total deverá ser de 3%. Exceção: os gelados comestíveis de laranja e de tangerina deverão ter no mínimo 6% de fruta fresca, polpa, suco ou equivalente.



## Anexo II

### **RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº. 266, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005.**

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o art. 11 inciso IV do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c do Art. 111, inciso I, alínea "b" § 1º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº. 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 29, de agosto de 2005,

considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população;

considerando a necessidade de atualização da legislação sanitária de alimentos, com base no enfoque da avaliação de risco e da prevenção do dano à saúde da população;

considerando que os regulamentos técnicos da ANVISA de padrões de identidade e qualidade de alimentos devem priorizar os parâmetros sanitários;

considerando que o foco da ação de vigilância sanitária é a inspeção do processo de produção visando a qualidade do produto final;

adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o "REGULAMENTO TÉCNICO PARA GELADOS COMESTÍVEIS E PREPARADOS PARA GELADOS COMESTÍVEIS", constante do Anexo desta Resolução.

Art. 2º As empresas têm o prazo de 01 (um) ano, a contar da data da publicação deste Regulamento, para adequarem seus produtos.

Art. 3º O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária sujeitando os infratores às penalidades previstas na Lei nº. 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis.

Art. 4º Revogam-se as disposições em contrário, em especial a Portaria SVS/MS nº. 379/99.

Art. 5º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

DIRCEU RAPOSO DE MELLO

ANEXO

### **REGULAMENTO TÉCNICO PARA GELADOS COMESTÍVEIS E PREPARADOS PARA GELADOS COMESTÍVEIS**

#### **1. ALCANCE**

Fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os Gelados Comestíveis e os Preparados para Gelados Comestíveis.

#### **2. DEFINIÇÃO**

2.1. Gelados Comestíveis: são os produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas; ou de uma mistura de água e açúcar(es). Podem ser adicionados de outro(s) ingrediente(s) desde que não descaracterize(m) o produto.

2.2. Preparados para Gelados Comestíveis: são os produtos que, após serem submetidos ao congelamento, resultam em gelados comestíveis, não necessitando da adição de outro(s) ingrediente(s).

### 3. DESIGNAÇÃO

3.1. Gelados Comestíveis: devem ser designados por denominações consagradas pelo uso. Podem ser usadas expressões relativas ao ingrediente que caracteriza o produto e ou ao processo de obtenção e ou forma de apresentação e ou característica específica.

3.2. Preparados para Gelados Comestíveis: devem ser designados conforme o item 2.2 (Definição). Podem ser usadas expressões relativas ao ingrediente que caracteriza o produto e ou ao processo de obtenção e ou forma de apresentação e ou característica específica.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4.1. BRASIL. Decreto nº. 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 abr. 1965. Seção 1.

4.2. BRASIL. Decreto - Lei nº. 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 out. 1969. Seção 1.

4.3. BRASIL. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todos do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 dez. 1988. Seção 1.

4.4. BRASIL. Lei nº. 8.078, de 11 de setembro de 1990. Código de Defesa do Consumidor. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 set. 1990. Suplemento.

4.5. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 1.428, de 26 de novembro de 1993. Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 dez. 1993. Seção 1.

4.6. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 326, de 30 de julho de 1997. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 ago. 1997. Seção 1.

4.7. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico Referente à Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 jan. 1998. Seção 1.

4.8. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 29, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 15 jan. 1998. Seção 1.

4.9. BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 685, de 27 de agosto de 1998. Regulamento Técnico de Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos e seu Anexo: Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 ago. 1998. Seção 1.

4.10. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 16, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de Procedimento para Registro de alimentos e ou novos ingredientes. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 03 mai. 1999. Seção 1.

4.11. BRASIL. Resolução ANVISA/MS nº. 17, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Diário Oficial

da União, Brasília, DF, 03 mai. 1999. Seção 1.

4.12. BRASIL. Resolução ANVISA/MS nº. 384, de 05 de agosto de 1999. Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 3-Gelados Comestíveis. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 ago. 1999, Seção 1.

4.13. BRASIL. Resolução ANVISA/MS nº. 386, de 05 de agosto de 1999. Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares segundo as Boas Práticas de Fabricação e suas funções. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 ago. 1999, Seção 1.

4.14. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 22, de 15 de março de 2000. Dispõe sobre os Procedimentos de Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Importados Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 mar. 2000. Seção 1.

4.15. BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 23, de 15 de março de 2000. Dispõe sobre o Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 16 mar. 2000. Seção 1.

4.16. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1.

4.17. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 234, de 19 de agosto de 2002. Regulamento Técnico sobre aditivos utilizados segundo as Boas Práticas de Fabricação e suas Funções. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 ago. 2002. Seção 1.

4.18. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 259, de 20 de setembro de 2002. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 set. 2002. Seção 1.

4.19. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 06 nov. 2002. Seção 1.

4.20. BRASIL. Lei nº. 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 mai. 2003. Seção 1.

4.21. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 175, de 08 de julho de 2003. Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 jul. 2003. Seção 1.

4.22. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1.

4.23. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1.

## 5. REQUISITOS ESPECÍFICOS

- Gelados Comestíveis: densidade aparente mínima de 475 g/litro.

## 6. REQUISITOS GERAIS

6.1. Os produtos devem ser obtidos, processados, embalados, armazenados, transportados e conservados em condições que não produzam, desenvolvam e ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor. Deve ser obedecida a legislação vigente de Boas Práticas de Fabricação.

6.2. Os produtos devem atender aos Regulamentos Técnicos específicos de Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação; Contaminantes; Características Macroscópicas, Microscópicas e Microbiológicas; Rotulagem de Alimentos Embalados; Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados; Informação Nutricional Complementar, quando houver; e outras legislações pertinentes.

6.3. A utilização de ingrediente que não é usado tradicionalmente como alimento pode ser autorizada, desde que seja comprovada a segurança de uso em atendimento ao Regulamento Técnico específico.

### ANEXO III

#### *Inibição dos Microrganismos pelos condimentos*

As propriedades antimicrobianas dos condimentos têm sido bastante estudadas, principalmente, com referência inibição de microrganismos patogênicos.

Pesquisas têm revelado os efeitos inibidores cebola e alho; pimenta-da-jamaica, orégano e cebola; canela; noz-moscada, caril, mostarda, pimenta-preta, tomilho e orégano; noz-moscada, louro, pimenta-do-reino; e alecrim sobre vários microrganismos, incluindo *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Clostridium botulinum*.

Além da atividade antibacteriana, muitos condimentos também apresentam atividade antifúngica, sendo verificadas inibição do crescimento e produção de toxinas de espécies de *Aspergillus flavus* com a utilização de tomilho, orégano, cravo e canela. KATAYAMA e NAGAI estudaram o efeito antimicrobiano dos terprnos, componente da fração volátil de vários condimentos, e identificaram o eugenol, extraído do cravo, como o mais efetivo. (LUCHESE, 1987).

A resistência de diferentes microrganismos a um dado condimento e de um mesmo organismo a diferentes condimentos tem apresentado considerável variação. Os fungos são os mais sensíveis, e as bactérias esporuladas, as mais resistentes.

Efeitos inibidores de alguns condimentos, dentre os quais o cravo, a canela, a pimenta – preta e o alho sobre bactérias também têm sido observados. Alguns resultados sugerem, no entanto, que os níveis adequados de condimentos utilizados normalmente em alimentos não afetam o crescimento de cultura, a menos que sejam usados na forma de óleo essencial.

#### *Estimulação dos Microrganismos pelos Condimentos*

Alguns condimentos, tipicamente utilizados na formulação de alimentos, têm influência direta na taxa de sobrevivência através da produção de ácidos pelas culturas ativas, o que não é observado no sorvete, devido à traços de atividade metabólica dos microrganismos presentes no inóculo adicionado à calda em uma temperatura de 6° C e à baixa temperatura de armazenamento, aproximadamente de -18°C.

Segundo LUCHESE, 1987, mistura de condimentos (pimenta-preta, noz, pimenta-da-jamaica, canela, gengibre, mostarda e flor de noz-moscada) utilizada em formulação de produto, a taxa de fermentação diminuía mesmo com a utilização de culturas microbianas. ZAIKA E KISSINGER, 1966, estudando o efeito de diferentes concentrações de gengibre, páprica, mostarda, flor de noz-moscada, canela e cravo da Índia na acidificação produzida por *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus cerevisae* em meio líquido, verificaram que 4,8 e 12 g/l todos os condimentos, exceto o cravo, foram estimuladores. O cravo foi inibidor de bactérias lácticas em concentrações acima de 4g/l, porém estimulador em baixas concentrações como 0,5 – 2,0 g/l.

Alspice é um preparado em pó de canela, noz moscada e de cravo da Índia. A finalidade do uso deste saborizante é de oferecer à massa de sorvete um sabor diferencial, conferindo sensorialmente um sabor picante ao mesmo.

A canela é extraída do caule da caneleira, uma árvore de ciclo perene, que chega a tingir 9 metros de altura. O seu tronco alcança até 350 cm de diâmetro. As folhas, verde-claras, são brilhantes e lisas, com nervuras na base. As flores, pequenas, agrupadas em cachos ramificados, vão do amarelo ao esverdeado. Apresenta aroma forte e sabor doce, sendo ligeiramente amarga. É composta por sacarose, tanino, vanilina, aldeído cinâmico e cálcio.

Na França, a canela é mais consumida em compotas e sobremesas; apresentando algumas propriedades; sendo adstringente, anti-séptica, digestiva, estimulante e sedativa. Apresenta funções terapêuticas em gases abdominais, úlceras estomacais causadas por stress, hipertensão arterial.

Misticamente, a canela é considerada o símbolo da sabedoria e do amor.

A árvore da noz-moscada, que chega a atingir 20 metros de altura, é graciosa e perfumada. Suas folhas são parecidas com as do louro, e suas flores têm a forma de sino. Seus

frutos, semelhantes ao damasco, mas da cor do limão, quando amadurecem se desintegram, revelando uma cobertura carmesim, que envolve uma única semente de coloração castanha, a qual depois de seca ao sol, se quebra e revela aquilo em que se constitui a noz-moscada, que apresenta propriedades, sendo estimulante, afrodisíaca, anti-inflamatória, digestiva e diurética. O seu sabor é levemente adocicado.

O nome noz-moscada deriva do latim *nux muscatus*. Era utilizada no princípio, para aromatizar cervejas. Na Itália era usada para perfumar as ruas, em dias de grandes comemorações. No início do século XVIII, chegou a alcançar a reputação de um medicamento, e por isso lhe era atribuída a função de cura para cerca de 140 doenças.

O óleo essencial da noz-moscada é utilizado em conservas, perfumaria e alguns medicamentos.

O nome científico antigo do cravo-da-índia, *Eugenia caryophyllata*, deriva da palavra grega "karyophyllon" que significa "folha-noz". Da China é que veio a primeira indicação do uso do cravo-da-índia como condimento, remédio e elemento básico para elaboração de perfumes especiais e incensos aromáticos. Na China, era então conhecida por "ting hiang" e na dinastia Han (206 a.C. - 220 d.C.) seus frutos foram levados para a corte do imperador por enviados da Ilha de Java. Conta-se que os próprios javaneses mantinham um pequeno fruto na boca para melhorar o hálito, antes de ir falar pessoalmente com o imperador.

Hoje, a ciência já é capaz de explicar esse uso: é que o eugenol, óleo essencial presente nesta especiaria apresenta efeitos antiinflamatório, cicatrizante, analgésico.

O cravo-da-índia é uma planta de porte arbóreo, de ciclo perene e que atinge cerca de 12 metros de altura. A copa é bem verde, de formato piramidal. As folhas são semelhantes às do louro, ovais, opostas e de coloração verde brilhante, com numerosas glândulas de óleo visíveis contra a luz. As flores são pequenas, branco-amareladas, agrupadas em cachos terminais. O fruto é do tipo baga e de formato alongado, suculentos, vermelhos e comestíveis. Aroma forte e penetrante. Os cravos-da-índia que usamos na culinária são, na realidade, os botões florais (ainda não abertos) desta uma árvore. É composto por eugenol, acetato de eugenol, beta-cariofileno, ácido oleânico, triterpeno, benzaldeído, ceras vegetais, cetona, chavicol, resinas, taninos, ácido gálico, esteróis, esteróis glicosídicos, kaempferol e quercetina. Não se deve exagerar no consumo do cravo. Este condimento pode irritar a mucosa da boca. Além disso, quem tem o estômago mais sensível também deve usá-lo com moderação.

O cravo-da-índia é um condimento versátil que pode ser usado tanto em pratos doces como em pratos salgados. É normalmente empregado no preparo de caldos, ensopados, doces, pudins, bolos, tortas de maçã, pães, vinhos e ponches quentes e licores. O eugenol, presente no óleo essencial, tem ação bactericida, o que o torna útil para preservar e prolongar a validade de compotas e conservas. No Brasil, o cravo-da-índia é usado mesmo para pratos doces, hábito adquirido da nossa colonização portuguesa. É contra-indicado para gestantes, pois pode provocar contrações na musculatura do útero.

A concentração de canela adicionada à mistura para sorvete foi inferior a 10 g/l de calda. A de noz-moscada adicionada a calda sorvete foi inferior a 1 g/l de calda e a de cravo-da-índia foi inferior a 0,5 g/l de calda.