

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

**DISSERTAÇÃO**

**Papel do Mel em Sorvete Potencialmente Probiótico: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 e *Lactocaseibacillus rhamnosus* DTA 72 sobrevivem a passagem pelo trato gastrointestinal, *in vitro*.**

**Jônatas Gomes de Souza**

**2022**



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Papel do Mel em Sorvete Potencialmente Probiótico: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 e *Lactobacillus rhamnosus* DTA 72 sobrevivem a passagem pelo trato gastrointestinal, *in vitro*.**

**Jônatas Gomes de Souza**

*Orientador (a):*

**Rosa Helena Luchese**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada com  
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S278p SOUZA, JONATAS GOMES DE, 1995 Papel do Mel em Sorvete Potencialmente Probiótico: Bifidobacterium animalis subsp. lactis BLC1 e Lacticaseibacillus rhamnosus DTA 72 sobrevivem a passagem pelo trato gastrointestinal, in vitro. / JONATAS GOMES DE SOUZA. - Seropédica, 2022. 52 f.

Orientador: ROSA HELENA LUCHESE.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS/PPGCTA, 2022.

1. Lactobacilos. 2. Prebiótico. 3. Aditivos Naturais.  
I. LUCHESE, ROSA HELENA, 1957-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS/PPGCTA III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TERMO Nº 189/2022 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.013026/2022-64

Seropédica-RJ, 01 de março de 2022.

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

**JONATAS GOMES DE SOUZA**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.  
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/02/2022

\_\_\_\_\_  
Dra. ROSA HELENA LUCHESE, UFRRJ  
(orientador)

\_\_\_\_\_  
Dr. ROMULO CARDOSO VALADAO, UFRRJ

\_\_\_\_\_  
Dr. ANDRE FIORAVANTE  
GUERRA, CEFET/RJ

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG.

*Documento não acessível publicamente*

*(Assinado digitalmente em 03/03/2022 09:56)*

ROMULO CARDOSO VALADAO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DTA (12.28.01.00.00.00.46)  
Matrícula: 3467131

*(Assinado digitalmente em 02/03/2022 14:55)*

ROSA HELENA LUCHESE  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DTA (12.28.01.00.00.00.46)  
Matrícula: 359403

*(Assinado digitalmente em 03/03/2022 09:22)*

ANDRÉ FIORAVANTE GUERRA  
ASSINANTE  
EXTERNO  
O CPF:  
064.179.  
236-06

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimento primeiramente a Deus que sempre foi meu alicerce, minha família, minha orientadora Prof. Rosa Luchese, todo o grupo de pesquisa e corpo técnico do laboratório de microbiologia do DTA/UFRRJ por viabilizar a produção desta dissertação.

## RESUMO

O desenvolvimento de produtos alimentícios saudáveis tem tomado grandes proporções, e o sorvete possui diversas características inerentes que podem contribuir para a sobrevivência das culturas probióticas. *Bifidobacterium* não tolera alta acidez, assim como ambientes com alto potencial redox. Para contornar problemas tecnológicos e aumentar a sobrevivência de bifidobactérias em leites fermentados, têm sido utilizadas associações mutualistas com outras bactérias, probióticas ou não. O grande desafio para os probióticos é a passagem pelo trato gastrointestinal, o que reduz a viabilidade das culturas. Diante desse desafio, o mel, conhecido como prebiótico, foi adicionado à formulação do sorvete. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* associada ou não a *Lacticaseibacillus rhamnosus* em sorvete adoçado com mel comparado ao produto adoçado com frutose, glicose e sacarose nas proporções encontradas no mel. O sorvete também foi avaliado quanto às características reológicas, sensoriais. Verificou-se que não houve redução na viabilidade de ambas as culturas, associadas ou não, nos dois tipos de sorvete ao longo do período de 49 dias de armazenamento. Aos 60 dias houve redução de apenas 1 ciclo logarítmico em todas as amostras, com contagens em torno de  $10^7$  UFC/g. Em relação à viabilidade após simular a passagem pelo trato gastrointestinal, verificou-se que as cepas associadas tendem à estabilidade na perda de viabilidade quando comparadas à cultura axênica de *L. rhamnosus*. O mel não apresentou efeito prebiótico para *L. rhamnosus*. No entanto, *Bifidobacterium* manteve sua viabilidade na presença de mel.

**Palavras-chaves:** Lactobacilos, Prebiótico, Aditivos Naturais,

## ABSTRACT

Healthy food product development has taken on great proportions, and ice cream has several inherent characteristics that can contribute to the survival of probiotic cultures. *Bifidobacterium* does not tolerate high acidity, as well as environments with high redox potential. To circumvent technological problems and increase the survival of bifidobacteria in fermented milks, mutualist associations with other bacteria, probiotics or not, have been used. The major challenge for probiotics is the passage through the gastrointestinal tract, which reduces the viability of cultures. In view of this challenge, honey, known to be prebiotic was added to the ice-cream formulation. The objective of this research was to evaluate the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* associated or not with *Lactobacillus rhamnosus* in ice cream sweetened with honey compared to the product sweetened with fructose, glucose and sucrose in the proportions found in honey. Ice cream was also evaluated regarding the rheological, sensory characteristics. It was verified that there was no reduction in the viability of both cultures, associated or not, in the two types of ice cream over the period of 49 days of storage. At 60 days there was a reduction of only 1 log cycle in all samples, with counts around  $10^7$  CFU/g. Regarding the viability after simulating the passage through the gastrointestinal tract, it was found that the associated strains tend towards stability in the loss of viability when compared to the axenic culture of *L. rhamnosus*. Honey did not have a prebiotic effect for *L. rhamnosus*. In contrast, *Bifidobacterium* maintained its viability in the presence of honey.

**Key words:** Lactobacillus, Prebiotic, Natural Additives

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1	Sorvete .....	4
2.2	Culturas probióticas.....	6
2.3	Benefícios dos probióticos.....	7
2.4	Modulação de microbiota intestinal.....	8
2.5	Mel de Abelha .....	9
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Culturas probióticas.....	15
3.2	Liofilização das culturas probióticas: .....	15
3.3	Planejamento experimental .....	15
3.4	Elaboração do sorvete .....	16
3.5	Análises Físicas .....	18
3.6	Teste de derretimento.....	18
3.7	Microscopia .....	18
3.8	Análise de Overrun .....	18
3.9	Análises Microbiológicas .....	19
3.9.1	Sobrevivência dos probióticos no sorvete congelado antes e após submeter as condições que mimetizam o trânsito gastrointestinal (GIC).....	19
3.10	Análise Sensorial .....	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
4.1	Viabilidade da cultura probiótica nos sorvetes e após simulação da passagem pelo trato gastrointestinal. ....	21
4.2	Qualidade higiênico -sanitária dos sorvetes. ....	25
4.3	Análise sensorial.....	25
	Análises físicas .....	28
4.4	Teste de derretimento.....	28

4.5	Overrun .....	29
4.6	Microscopia .....	30
4.7	Potencialidades do produto para sua migração da academia para o mercado consumidor .....	32
5	CONCLUSÃO .....	33
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## 1 Introdução

Nos últimos anos, tem havido uma tendência em torno do desenvolvimento de produtos funcionais. Assim sendo, o setor alimentício, em geral, vem aplicando esforços a fim de consolidar essa demanda e desenvolver alimentos funcionais, que colaborem com a saúde do consumidor (VILLALVA; CRAVERO BRUNERI; VINDEROLA; GONCALVEZ DE OLIVEIRA *et al.*, 2017). Nessa classificação, o consumo de produtos lácteos é promissor, pois têm a capacidade de fornecimento de muitos micro e macronutrientes (ASTRUP, 2014), considerados benéficos à saúde (THORNING; BERTRAM; BONJOUR; DE GROOT *et al.*, 2017) exceto em casos de pessoas com restrição.

Os alimentos lácteos congelados são classificados pelo envolvimento de leite e materiais secos, frutas, podendo ainda ser acrescido de gordura do leite e ar ou não, sendo o sorvete de leite o mais consumido nessa classe de produtos (GOFF; HARTEL, 2013). Ele pode ser um alimento de notável agregação a alimentação, pois uma formulação adicionada de frutas, especiarias, leites, prebióticos e probióticos, podem fornecer micronutrientes e colaborar para uma condição mais saudável para o organismo do consumidor, e assim se vem ocorrendo diversos estudos a fim ligar propriedades funcionais a algumas formulações de sorvetes (ERKAYA; DAĞDEMİR; ŞENGÜL, 2012; SUN-WATERHOUSE; EDMONDS; WADHWA; WIBISONO, 2013). Além das propriedades funcionais que podem ser agregadas, também há a possibilidades de desenvolvimento de produtos sem a utilização de aditivos sintéticos, por meio do uso de pigmentos naturais, compostos bioativos, e compostos estruturais do produto a partir de frutas e hortaliças, reduzindo teor de gorduras e açúcares (SUN-WATERHOUSE, 2011; VAN KLEEF; VAN TRIJP; LUNING; JONGEN, 2002).

O sorvete contém características intrínsecas, que podem colaborar com a sobrevivência de culturas probióticas no produto e após a passagem pelo trato gastrointestinal, visto que contém uma grande quantidade de macronutrientes que podem facilitar esse processo, como as proteínas do leite e do soro do leite, gorduras que atuam como crioprotetores, lactose que aumentam a quantidade de sólidos presentes, os micronutrientes presentes em frutas e outros vegetais utilizados além de um pH próximo da neutralidade (DA SILVA; DE FÁTIMA BEZERRA; DOS SANTOS; CORREIA, 2015; DI CRISCIO; FRATIANNI; MIGNOGNA; CINQUANTA *et al.*, 2010; EL-SAYED; SALAMA; EL-SAYED, 2014).

Nos estudos que envolvem produtos lácteos probióticos, cepas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais utilizadas, (SAXELIN; TYNKKYNEN;

MATTILA-SANDHOLM; DE VOS, 2005), sendo que produtos formulados com lactobacilos respondem por um crescimento nos últimos dez anos, de cerca de 1000%. No caso das bífidos também é alto o crescimento no número desses estudos, assim como o estudo do condicionamento das duas cepas. Lactobacilos são mais resistentes a presença de oxigênio que bífidos, permitindo uma maior utilização e adaptação da bactéria ao sorvete, visto que o produto tem uma etapa fundamental no processo de sua fabricação que é a de incorporação de ar (GIBSON; PROBERT; VAN LOO; RASTALL *et al.*, 2004). Ultimamente, fibras alimentares e oligossacarídeos têm sido utilizados como ingredientes prebióticos na formulações de sorvete (DI CRISCIO; FRATIANNI; MIGNOGNA; CINQUANTA *et al.*, 2010; EL-SAYED; SALAMA; EL-SAYED, 2014). O trato gastrointestinal humano, é formado por um grande e complexo número de microrganismos, que pode chegar a trilhões, que são denominados de microbiota intestinal (THURSBY; JUGE, 2017). Ela é responsável por diversas funções metabólicas do organismo do hospedeiro (NAGPAL; MAINALI; AHMADI; WANG *et al.*, 2018). E por este motivo, com o intuito de beneficiar a microbiota benéfica intestinal, a adição de fibras alimentares e oligossacarídeos (prebiótico) em formulações de sorvete (DI CRISCIO; FRATIANNI; MIGNOGNA; CINQUANTA *et al.*, 2010; EL-SAYED; SALAMA; EL-SAYED, 2014), vêm sendo utilizada como estratégia nutricional e biotecnológica.

Probióticos, são microrganismos vivos, que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (OMS/FAO, 2002; ISAPP, 2014). Inicialmente, para ser considerado probiótico o produto deveria conter cerca de  $10^7$  UFC/mL de concentração mínima para atingir esse status segundo a Federação Internacional de Laticínios (FIL/IDF) (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005). Atualmente, entretanto, valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. A documentação referente à comprovação da eficácia deve incluir relatório de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade e teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e sais biliares. No Brasil, o uso de probióticos em alimentos requer prévia avaliação da Anvisa, segundo requisitos da Resolução RDC Anvisa nº 241, de 27 de julho de 2018. A avaliação efetuada contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico.

O fato de o sorvete ser um produto que tem grande apelo da população em questão sensorial, que além disso pode ser valorizado e possibilitar do ponto de vista tecnológico, um

alimento que auxilie na melhoria da saúde em função da probioticidade, levou a escolhas desta matriz como veículo de culturas com potencial probiótico. O desenvolvimento de um sorvete onde são veiculadas as culturas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em cultura axênica e associada com *Lactiseibacillus rhamnosus* DTA 72, propicia um aumento do valor agregado pelo apelo funcional e de benefício a saúde, vindo de encontro a esta tendência.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Sorvete

Segundo a Portaria n° 379, de 26 de abril de 1999 a categoria de gelados comestíveis agrupa uma diversidade de produtos, dentre eles pode-se subdividir em produtos de base látea, como os sorvetes, e de base não látea denominados de sorbet (Brasil, 1999). Estes produtos são formados por uma emulsão de água e gordura, podendo conter nessa emulsão também ar.

Deve ser processado segundo as boas práticas de fabricação, para obter segurança microbiológica, desde sua cadeia produtiva até a comercialização nos pontos de vendas. Concomitantemente, a legislação brasileira obriga a todos os gelados comestíveis que forem a base de leite ou adicionados de derivados lácteos, de mesmo modo com ovos ou derivados de ovos, a fazerem um tratamento térmico chamado de pasteurização (BITTENCOURT, 2016).

O *overrun* é a taxa incorporação de ar ao sorvete, que é uma emulsão de ar em óleo e água, que torna o produto mais macio, leve e diminui sua resistência a mastigação (ORDOÑEZ; RODRÍGUEZ; ÁLVAREZ; SANZ *et al.*, 2005). Para que o *overrun* ocorra de forma satisfatória em sorbet e sorvete (densidade mínima 475 g/litro sugerindo um *overrun* de 110%; (BRASIL, 2005) é necessário o uso de aditivos estabilizantes e emulsificantes para modificar capacidade de ligação à água, taxas de congelamento, formação de cristais de gelo e propriedades reológicas, diferentemente do sorvete que tem um maior teor de gordura (ADAPA; DINGELDEIN; SCHMIDT; HERALD, 2000; ARELLANO, 2013; REGAND; GOFF, 2003).

Dentre os estabilizantes, a carragena é o aditivo com maior uso e ajuda a prevenir a separação da mistura de óleo e água. Já os emulsificantes compostos em sua maioria por lecitina, mono e di-glicerídeos de ácidos graxos são substâncias que contém uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, e se situam na interface entre a água e a gordura, ou entre a água e o ar. Consequentemente, agem reduzindo a tensão na interface tornando a mistura mais estável e facilitando a formação de emulsões de espuma (ar em suspensão) (MOSQUIM, 1999).

A proteína do leite é formada por albuminas, globulinas e, majoritariamente, por caseína. Estes compostos proteicos tem diversas funções atreladas, como: aeração, emulsificação, menor formação de cristais de gelo, adesão pelas partes hidrofóbicas de gorduras que gera emulsão e estabilidade do sorvete (SOUZA; COSTA; DE RENSIS; SIVIERI, 2010). As caseínas têm capacidade de retenção de água em torno de 3g de água/g de caseína, já as do soro tem a capacidade de 1 g de água/g de proteína, porém essas funções podem ser melhoradas através de processos térmicos que causam desnaturação da proteína do soro sobre a caseína formando um

complexo proteico capaz de reter mais água do que as proteínas separadamente. Esta maior capacidade de reter água gera menor formação de cristais de gelo e melhores características emulsificantes pelo fato de essas proteínas aderirem melhor gorduras (GOFF; KINSELLA; JORDAN, 1989; GOFF; JORDAN, 1989).

A presença de gorduras em sorvete, geralmente com um teor de 8% a 20% (PEARSON, 1978) é o ingrediente de maior importância e muda o seu teor de acordo com a qualidade do produto final gerado (SOUZA; COSTA; DE RENSIS; SIVIERI, 2010). A melhor fonte de gordura láctea é a do creme de leite, também podendo ser utilizada outras como manteiga. Além disso, o teor de gordura tem função sensorial de gerar uma menor sensação da baixa temperatura do produto na boca, melhor sabor e mais cremosidade (SOUZA; COSTA; DE RENSIS; SIVIERI, 2010).

A lactose é um dissacarídeo, principal carboidrato presente no leite, composta por uma glicose e uma galactose ligadas através uma de ligação glicosídica  $\beta 1 \rightarrow 4$  (SWAGERTY; WALLING; KLEIN, 2002), muito presente na composição do sorvete, porém tem uma debilidade relacionada a esse dissacarídeo, sua solubilidade em água é baixa em comparação com a sacarose, o que leva a altas concentrações da lactose gerarem grandes cristais, conseqüentemente a textura arenosa ao produto (SOUZA; COSTA; DE RENSIS; SIVIERI, 2010). Independentemente de utilizar leite ou não em gelados comestíveis é comum a adição de carboidratos como sacarose e xarope de glucose. Estudos apontam que a sacarose e as gorduras influenciam diretamente na qualidade sensorial do sorvete, sendo assim, a falta ou o uso demasiado interferem na palatabilidade do produto (SANTOS, 2009). O xarope de glucose é um produto utilizado para adoçar e dar mais viscosidade ao sorvete, de modo que a necessidade de adoçar ou dar corpo é analisada pelo número de dextrose equivalente (DE) desejado, sendo que quanto maior o DE mais hidrolisado é o polissacarídeo, conferindo maior dulçor, semelhante ao da sacarose. Entretanto se esse xarope usado for classificado com um DE menor, se obtém um produto mais estruturado e menor sensação de doce, pois a cadeia de polissacarídeo é menos hidrolisada.

A incorporação de bactérias probióticas ao sorvete pode ser interessante, já que os gelados apresentam características adequadas para funcionar como veículo desses organismos na dieta humana. Pela relação com o seu pH neutro, presença de gorduras e carboidratos e a boa aceitação sensorial, o sorvete simbiótico está se tornando um produto com características desejáveis. O pH próximo de 7 oferece possibilidade de melhorar a sobrevivência de bactérias probióticas. Outros fatores que interferem na sobrevivência e eficiência dos probióticos é a

quantidade de células inoculadas, temperatura, tipo de produto lácteo e presença de ar, além da velocidade de congelamento que afeta dramaticamente a viabilidade das células probióticas. A perda de viabilidade de organismos probióticos em sobremesas congeladas deve-se ao efeito da operação de congelamento na parede celular ou à toxicidade do oxigênio (HOMAYOUNI; AZIZI; EHSANI; YARMAND *et al.*, 2008).

## 2.2 Culturas probióticas

Nas últimas décadas, há um grande avanço na pesquisa, e se alcançou um enorme número de evidências que sugerem atuação positiva da composição da microbiota por ação externa, visto que hábitos alimentares podem se tornar interferentes, na seleção e estabilidade dos microrganismos (DOS SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Os probióticos podem ser identificados por gênero, espécie e nível de cepa, e em sua maioria são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Sacharomyces*. Os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são bactérias sacarolíticas pertencentes ao grupo das bactérias lácticas, com potencial fermentativo de carboidratos gerando ácido láctico (homofermentativas) ou principal produto juntamente com ácido acético e CO<sub>2</sub> (hetero-fermentativas e hetero-fermentativas facultativas). *Lactobacillus* spp. estão presentes no intestinos de indivíduos saudáveis (MIZOCK, 2015).

Os lactobacilos são mais difundidos pela natureza, existem diversas cepas isoladas de origem humana, que promovem grande adaptação a passagem do trato humano, mas também se pode isolar de várias matrizes distintas, como material vegetal (CAMPANARO; TREU; VENDRAMIN; BOVO *et al.*, 2014), alimentos fermentados (POGAČIĆ; SAMARŽIJA; CORICH; D'ANDREA *et al.*, 2010; REZAC; KOK; HEERMANN; HUTKINS, 2018), solo (KIM; LEE; LIM; KIM *et al.*, 2018). A resistência e adaptação as condições gastrointestinais são importantes na escolha do microrganismo probiótico (OUWEHAND; SALMINEN; ISOLAURI, 2013; SAARELA; MOGENSEN; FONDEN; MÄTTÖ *et al.*, 2000) visto o alto grau de estresse gerado pela passagem do mesmo pelo trato gastrointestinal (MILLETTE; NGUYEN; AMINE; LACROIX, 2013).

A agregação entre cepas de *Lactobacillus* seria causada por um peptídeo semelhante a um feromônio, induzindo a ligação de proteínas na parede celular do outro, promovendo assim a agregação, sendo de fundamental importância na formação de biofilmes bacterianos em superfícies que impedem a adesão de microrganismos indesejáveis (BORIS; SUAREZ; BARBES, 1997)

Para que as células sejam agregadas sob a influência do fator promotor de agregação é necessária a presença de ácidos lipoteicóico ou teicóico que agiriam como receptores para a proteína que promove a agregação. Estes componentes da superfície da célula foram chamados de substância de união e substância de agregação (BORIS; SUAREZ; BARBES, 1997)

Assim esses ácidos são muito importantes na resposta da interação entre os microrganismos e na modulação da microbiota intestinal. No entanto, há uma escassez de informações a respeito da sua presença na parede de alguns microrganismos como *Bifidobacterium* (COLAGIORGI; TURRONI; MANCABELLI; SERAFINI et al., 2015).

Os ácidos lipóicos e teicóicos, presentes na parede de bactérias Gram-positivas, também protegem e ajudam na sobrevivência ao congelamento, com uma inserção de 1% p/v, a taxa de sobrevivência aumentou em 50%, porém as bactérias também podem utilizar sais, ácidos nucleicos e lipídios como agentes anticongelantes. O ácido teicóico atua diminuindo a cinética de cristalização através de um mecanismo que mantém a água líquida e assim aumenta bastante a viabilidade bacteriana (DEMIRCI; AKTAŞ; SÖZERI; ÖZTÜRK et al., 2017).

### **2.3 Benefícios dos probióticos**

O uso de produtos fermentados remonta aos tempos antigos de Civilizações egípcia e do Oriente Médio, quando a fermentação era um método de preservação de alimentos (MCFARLAND, 2015), porém foi a partir do século 19, que bifidobactérias foram isoladas, e começaram estudos para o descobrimento da atuação de probioticidade, ainda sem essa denominação (FULLER, 1994; MCFARLAND, 2015). Na década de 1960, o termo foi introduzido no universo acadêmicos, visando as bactérias consideradas benéficas ao trato gastrointestinal. No entanto, em 2001, a organização mundial da saúde, definiu probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (JOINT, 2002).

Esse tema é de grande importância, tem dominado por décadas o interesse científico, e evidências de estudos em animais e humanos mostraram atividades benéficas na microbiota (FERRARIO; TAVERNITI; MILANI; FIORE et al., 2014; IRWIN; KHALESİ; COX; GRANT et al., 2018); reduzindo sintomas associados a níveis e perfil lipídicos do sangue (GUO; LIU; ZHANG; SHEN et al., 2011; SUN; BUYS, 2015) na remoção de micotoxinas (NIKBAKHT NASRABADI; JAMALUDDIN; ABDUL MUTALIB; KHAZA'AI et al., 2013); na redução da pressão arterial e hipertensão (KHALESİ; SUN; BUYS; JAYASINGHE, 2014); no controle de diabetes e regulação de teor de açúcar no sangue (NIKBAKHT; KHALESİ; SINGH;

WILLIAMS *et al.*, 2018; SUN; BUYS, 2016); no aumento de função cognitivas Laureano-Melo *et al.*, 2019) .

Estudos recente mostraram que certas bactérias intestinais, espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, podem exercer diversas características consideradas benéficas, inibindo *Streptococcus* e *Candida* entre outros. Além disso podem produzir muitos compostos bioativos, antimicrobianos de baixo peso molecular, como ácidos orgânicos entre outros compostos (HOMAYOUNI; AZIZI; EHSANI; YARMAND *et al.*, 2008).

## **2.4 Modulação de microbiota intestinal**

As comunidades bacterianas se tornam estáveis no corpo humano, após sofrerem diversos estresses, visto que são necessários um desenvolvimento e uma adaptação a cada um dos ambientes presentes no trato gastrointestinal. Sendo assim, essa microbiota pode ter influência direta dos hábitos alimentares (DOS SANTOS; VARAVALLO, 2011) .

O intestino é um órgão com funções fundamentais, com uma microbiota muito rica, pois pode conter cerca de 500 espécies incluindo as alóctones (membros adquiridos do meio externo) autóctones (membros permanentes) , que podem ser estáveis e assim geram um sistema de células intestinais, nutrientes e a microbiota (BEDANI; ROSSI, 2009; BOURLIOUX; KOLETZKO; GUARNER; BRAESCO, 2003; DOS SANTOS; VARAVALLO, 2011; WAITZBERG, 2009). Essa microbiota exerce as mais variadas relações, entre as quais pode se destacar o mutualismo, que é a proteção do organismo hospedeiro através da produção de nutrientes essenciais no desenvolvimento do sistema imunológico (MACHADO, 2008). Ainda se considera que para a manutenção do equilíbrio dessas populações, é recomendada a ingestão de probióticos, que são capazes de controlar a multiplicação dessas bactérias indesejáveis (WAITZBERG, 2009). E para o equilíbrio desses microrganismos, importante ressaltar fatores como: competição por espaço e nutriente, parasitismo, e atuação de metabólitos produzidos (BEDANI; ROSSI, 2009). A função antibacteriana é primordial no controle de patogênicos, e essa imunomodulação permite uma resposta das defesas imunológicas aos microrganismos patogênicos (MAIA; DE CERQUEIRA FIORIO; DA SILVA, 2018).

Alguns compostos considerados funcionais como os frutoligossacarídeos e inulina são positivos para essa relação com o hospedeiro, visto que através da fermentação seletiva pelos probióticos produz ácidos graxos de cadeia curta, que tem importância na redução do pH do cólon. Esses compostos, atuam seletivamente no crescimento de bactérias da microbiota intestinal, principalmente lactobacilos e bifidobactérias, e não obstante, podem inibir bactérias

patogênicas, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium perfringens* entre outras (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010). Além de colaboração nutricional favorecida através desse metabolismo.

## 2.5 Mel de Abelha

Dos produtos obtidos na colmeia, o mel é o mais importante, sendo o alvo do trabalho apícola brasileira (OLIVEIRA, 2018). O produto tem uma representatividade alta trabalho e renda para uma grande faixa de pequenos e médios produtores rurais do Brasil (SILVEIRA; JESUS; VIANA; SILVA, 2019).

O Brasil, como um grande produtor da agricultura que é, tem um elevado potencial apícola em diversas regiões, visto a pluralidade da flora que é cultivada em solo brasileiro, fato esse que colabora para a manutenção das colméias e também influenciam na vegetação (MARQUES; MUNIZ; LOPES; SILVA, 2011). De acordo com MARTINEZ e SOARES (2012) a atividade pode se expandir mais. O entrave à maior produção, entretanto, é a qualidade do mel ofertado ao mercado interno e externo (ROSSETO; PIRES; MELCHIOR; BOSQUESI *et al.*, 2015) que por vezes é muito abaixo do padrão desejável de micronutrientes e outros compostos, ou mesmo, é descaracterizado por uma má manipulação ou armazenamento.

A importância do mel é indicada, há milênios, visto que é um dos alimentos com mais histórico com o ser humano. Algumas pesquisas arqueológicas indicam que as abelhas sociais já produziam e estocavam o alimento há 20 milhões de anos, antes mesmo do surgimento do homem na Terra, que ocorreu há alguns milhares anos atrás (CAMARGO; OLIVEIRA; BERTO, 2017). Inclusive, o mel se torna um alimento com uma característica cultural muito forte, visto que há citações do mel no Antigo Testamento da Bíblia, bem como a sua relação com um lado medicinal, e sua fartura de suas colheitas, incluíam o produto como presente. Algumas sociedades antigas, também tiveram uma relação muito forte com este produto, a Babilônia e na Grécia Antiga, com a finalidade de preservar corpos de pessoas da alta classe social mortos em grandes batalhas (SABATINI; MARCAZZAN; CABONI; BOGDANOV *et al.*, 2009).

Outra sociedade milenar que valorizava substancialmente o mel era o Egito, como um fator medicinal importante, sendo um composto importante em boa parte dos remédios da época. Além disso em todas essas sociedades, o mel sempre era tido como referência de fartura para aquela determinada sociedade (RUSIG; NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2002). Um exemplo disso é uma citação muito antiga, presente na bíblia, que é uma fonte histórica rica,

em

**Êxodo3:8**

*“Por esse motivo desci a fim de livrá-los das mãos dos egípcios e tirá-los daqui para uma terra boa e vasta, onde mana leite e mel”.*

Essa relação com o mel na bíblia, tinha como objetivo se relacionar que a produção agrícola era boa, visto que assim era favorecida a produção do mel.

O mel é um adoçante natural, formado por um complexo de 60 a 85% carboidratos e 12 a 23% água), sendo que os monossacarídeos representam cerca de 75% dos açúcares, já os dissacarídeos 10-15% e uma pequena parcela de outros açúcares (MACHADO DE-MELO; ALMEIDA-MURADIAN; SANCHO; PASCUAL-MATÉ, 2018). Esse mono e dissacarídeos são os principais influenciadores dos fatores, como valor energético, viscosidade, higroscopicidade e granulação (KAMAL; KLEIN, 2011), alguns dos mais frequentemente detectados foram: frutose e glicose, em maior proporção. A proporção média é de 38,5% de frutose e 31,0% de glicose e são os compostos mais presentes no mel (DE LA FUENTE; RUIZ-MATUTE; VALENCIA-BARRERA; SANZ *et al.*, 2011; ESCUREDO; DOBRE; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ; SEIJO, 2014; TORNUK; KARAMAN; OZTURK; TOKER *et al.*, 2013), e de acordo com o Codex Alimentarius (2001), a quantidade mínima de açúcares redutores é de 60g/100g para mel (CODEX, 2001).

Outros açúcares encontrados no mel são sacarose, ramnose, trealose, nigerbiose, isomaltose, maltose, maltotetraose, maltotriose, maltulose, melezitose, melibiose, nigerose, palatinose, rafinose e outros (DE LA FUENTE; RUIZ-MATUTE; VALENCIA-BARRERA; SANZ *et al.*, 2011). A proporção de cada açúcar pode ser alterado no tempo de armazenamento, visto que há grande quantidade de enzimas que podem hidrolisar açúcar aumentando a proporção de glicose e frutose (RYBAK-CHMIELEWSKA, 2007). Essa degradação pode culminar em alteração de cor por atuação de reação de Maillard gerando mais compostos de aroma (MOREIRA; DE MARIA; PIETROLUONGO; TRUGO, 2010). A quantidade de sacarose é um fator importante na avaliação da maturidade do mel, a, pois a seu teor é analisado, visto que quanto mais maduro o mel existem atuações de enzimas endógenas e a clivagem da sacarose, aumentando assim o teor de frutose e glicose, também como medida contra adulterações (ESCUREDO; MÍGUEZ; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ; SEIJO, 2013; PUSCAS; HOSU; CIMPOIU, 2013; TORNUK; KARAMAN; OZTURK; TOKER *et al.*, 2013), com limite máximo de 5g em 100g de mel floral (CODEX, 2001).

O teor de proteínas do mel varia de acordo com espécies de abelhas e localidades de produção, podendo variar dentro de uma mesma espécie de 0,1 a 3,3% de proteína (WON; LI;

KIM; RHEE, 2009). O grão do pólen é a principal fonte de proteína no mel, e os aminoácidos, representam cerca de 1% (HERMOSÍN; CHICON; CABEZUDO, 2003). O aminoácido em maior proporção é a prolina (IGLESIAS; MARTÍN-ÁLVAREZ; POLO; DE LORENZO *et al.*, 2006), mas vários outros também, ácido glutâmico, ácido aspártico, glutamina, histidina, glicina, treonina,  $\beta$ -alanina, arginina,  $\alpha$ -alanina,  $\gamma$ -aminobutírico, tirosina, valina, metionina, cisteína, isoleucina, leucina, triptofano, fenilalanina, ornitina, lisina, serina, asparagina e alanina (HERMOSÍN; CHICON; CABEZUDO, 2003; KEČKEŠ; TRIFKOVIĆ; ANDRIĆ; JOVETIĆ *et al.*, 2013; REBANE; HERODES, 2010), sendo o mais comum o ácido glutâmico, alanina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina (DI GIROLAMO; D'AMATO; RIGHETTI, 2012).

Entre os constituintes em menor proporção, estão ácidos orgânicos estão presentes no mel como ácidos: ácido aspártico, butírico, cítrico, acético, fórmico, fumárico, galacturônico, fórmico, glucônico, glutâmico, glutárico, butírico, glioxílico, 2-hidroxi-butírico,  $\alpha$ -hidroxi-glutárico, isocítrico,  $\alpha$ -cetoglutárico, láctico, málico, malônico, metilmalônico, 2-oxopentanóico, propiônicos, pirúvicos, quinínicos, shiquímicos, succínicos, tartáricos, oxálicos e outros (CHERCHI; SPANEDDA; TUBEROSO; CABRAS, 1994; MATO; HUIDOBRO; SIMAL-LOZANO; SANCHO, 2006; NOZAL; BERNAL; GÓMEZ; HIGES *et al.*, 2003).

Os minerais, como potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, sódio, manganês, iodo, zinco, lítio, cobalto, níquel, cádmio, cobre, bário, cromo, selênio, arsênico e prata encontrada em diversas produções de mel (ALQARNI; OWAYSS; MAHMOUD; HANNAN, 2014).

As vitaminas presente no mel são: tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B8H) e ácido fólico (B9). A vitamina C também está presente, e o pH baixo ajuda a manter a viabilidade delas (BONTÉ; DESMOULIÈRE, 2013).

Enzimas são pequenas frações das proteínas presentes no mel, algumas delas são: invertase,  $\alpha$  e  $\beta$ -glucosidase, catalase, fosfatase ácida, diastase e glicose oxidase (SAK-BOSNAR; SAKAČ, 2012; WON; LEE; KO; KIM *et al.*, 2008).

Além disso, os produtos da reação Maillard, compostos voláteis e várias substâncias bioativas (fenóis flavonóides, entre outros), de grãos de pólen também fazem parte da composição de mel (MACHADO DE-MELO; ALMEIDA-MURADIAN; SANCHO; PASCUAL-MATÉ, 2018). Dentre esses compostos bioativos, já foram detectados cafeína, ácido fenilático, ácido isoferúlico, ácido gálico, ácido hidrobenzóico entre outros. (ÁLVAREZ-SUAREZ; GASPARRINI; FORBES-HERNÁNDEZ; MAZZONI *et al.*, 2014) Com atividade

de água entre 0,49 e 0,65, o mel está em uma condições satisfatórias de acordo com a Codex Alimentarius (2001). Essa composição do mel, rica em açúcares redutores e outros compostos bioativos, reduz o potencial redox, e assim atua como protetor de algumas culturas microbianas probióticas (FAVARIN; LAUREANO-MELO; LUCHESE, 2015).

Além de propriedades antimicrobianas, também se sabe que a os méis possuem forte propriedades antioxidantes , que influenciam na modulação de radicais livres, protegendo os componentes celulares (ALZHRANI; BOUKRAË; YUVA BELLIK; BAKHOTMAH *et al.*, 2012; HENRIQUES; JACKSON; COOPER; BURTON, 2006). Além das atividades antimicrobianas e antioxidantes, tem sido atribuído ao mel potencial de reduzir o crescimento de células cancerígenas, que pode acontecer por alguns meios como: apoptose de células através da despolarização mitocondrial, a inibição da ciclo-oxigenase pela presença de alguns constituintes, a liberação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) citotóxico (FORBES-HERNÁNDEZ; GIAMPIERI; GASPARRINI; MAZZONI *et al.*, 2014).

Ele pode ser classificado quanto à sua origem, mel floral ou mel de melato (melato). O mel floral é obtido dos néctares das flores, e ainda pode ser classificado em: mel unifloral ou monofloral (quando o produto procede principalmente da origem de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possua características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias) ou mel multifloral ou polifloral (obtido a partir de diferentes origens florais). O mel de melato é formado principalmente a partir de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas(FORBES-HERNÁNDEZ; GIAMPIERI; GASPARRINI; MAZZONI *et al.*, 2014).

Também pode ser classificado pela característica, de acordo com a instrução IN 11/2000 (2000), que regulamenta a identidade e qualidade do mel, as características sensoriais são: cor, sabor, aroma e consistência (viscosidade). A coloração, aroma e sabor do mel variam de acordo com a sua origem floral, podendo ser quase incolor (oriundo de flores como o assa-peixe), âmbar (flores de laranjeiras), escuro (eucalipto, silvestre) e pardo escuro (trigo sarraceno). Com a idade e conforme a temperatura de estocagem do mel observa-se escurecimento. O superaquecimento e contaminação com metais também podem escurecer o mel. De maneira geral, o mel escuro tem mais sais minerais do que o mel claro. Pesquisas mostram que os mais escuros podem ter de quatro a seis vezes mais sais minerais que os claros, com destaque para o manganês, potássio, sódio e ferro (RUSIG; NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2002). Nos mercados mundiais o mel é avaliado por sua cor, sendo que méis mais claros alcançam preços mais elevados(SOUZA; MARCHINI; DIAS; ODA-SOUZA *et*

al., 2009). Méis de meliponíneos caracterizam-se pela fluidez, devido ao alto teor de água, o que pode ser uma vantagem quando do envasamento e da decantação por menor período(SOUZA; MARCHINI; DIAS; ODA-SOUZA *et al.*, 2009).

Também quanto a físico química, é comum encontrar variações na sua composição física e química, tendo em vista que variados fatores interferem na sua qualidade, como condições climáticas, estágio de maturação, espécie de abelha, processamento e armazenamento, além do tipo de florada (DA SILVA; DE OLIVEIRA; NOBRE, 2009). As características físico-químicas observadas no mel proveniente da flor do cajueiro são marcantes e permitem caracterizá-lo como um produto próprio das áreas de cajucultura, sendo, portanto, típico da região Nordeste do Brasil. Sua coloração escura, acidez total acentuada e a quantidade de aminoácidos relativamente alta podem, juntamente com outros parâmetros, como o polínico e sensorial, ser características importantes na denominação da origem geográfica deste mel, agregando assim valor à produção regional (BENDINI; SOUZA, 2008).

O mel das abelhas sem ferrão (nativas) é um produto que tem apresentado uma demanda crescente de mercado, pelo sabor peculiar e pelas propriedades terapêuticas a ele atribuídas, obtendo preços mais elevados que o das abelhas do gênero *Apis* em diferentes regiões do Brasil. Entretanto, ainda existem poucos estudos e produção no país.

O mel, é um prebiótico com uma grande importância causada pela sua riqueza em compostos ácidos que podem modular positivamente a microbiota e favorecer o sistema imunológico (DE MELO; MENEZES; DE SOUSA; DOS SANTOS LIMA *et al.*, 2020; MACEDO; LUCHESE; GUERRA; BARBOSA, 2008). A inulina é tida como um dos compostos mais estudados nos últimos dez anos, e o mel também tem papel importante pois vem também com um número expressivo de estudos abordando o tema (DE MELO; MENEZES; DE SOUSA; DOS SANTOS LIMA *et al.*, 2020).

O objetivo foi avaliar a sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 e de *Lactobacillus rhamnosus* DTA 72 em associação ou não em sorvete com base láctea.

- Desenvolvimento de sorvete com base leite, adição de mel ou açúcares, capaz de manter a viabilidade de ambas as culturas em níveis aceitáveis.
- Avaliar diferença de viabilidade das culturas no produto adicionado de mel em comparação ao adoçado com frutose, glicose e sacarose nas proporções

encontradas no mel antes e após simulação processo de passagem pelo trato gastrointestinal (teste *in vitro*).

- Avaliar sensorialmente o produto com apelos nutricionais pelos consumidores pelo teste de aceitação.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Culturas probióticas**

Utilizou-se na pesquisa a cultura comercial de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 obtida liofilizada tipo DVS da Sacco®, Brasil e a cepa de *Lactocaseibacillus rhamnosus* (DTA 72) isolada de material fecal de recém-nascido com até duas semanas de idade, durante o trabalho de doutorado de Oliveira (2011) e identificado por sequenciamento do 16S rDNA usando RAPD-PCR conforme descrito por GUERRA; LEMOS JUNIOR; SANTOS; ANDRIGHETTO et al. (2018).. Esta última cultura faz parte da coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, Seropédica, Brasil, onde é mantida congeladas a -20 °C em caldo MRS adicionado de glicerol estéril (20%).

#### **3.2 Liofilização das culturas probióticas:**

. A cultura de *L. rhamnosus* para utilização no sorvete foi liofilizadas de modo a obter culturas tipo DVS (Direct Vat Set). Para liofilização a cultura congelada de *L. rhamnosus* foi inicialmente ativada por meio de três transferências sucessivas em caldo MRS comercial Merck, Darmstadt, Alemanha ) e incubação aeróbica (crescimento estático) a 36°C por 24 h. Após o terceiro subcultivo foi centrifugada a 3000 x g e o precipitado lavado com solução tampão fosfato (pH 7,0) e centrifugado novamente. A massa celular foi então suspensa em solução de leite desnatado (Molico®,) reconstituído a 13%, previamente esterilizado a 121°C por 10 minutos, e congeladas em tubos falcon em processo de congelamento rápido em etanol a -32°C com agitação. Posteriormente foram liofilizadas (Liofilizador de bancada L101 da Liotop®) e acondicionadas a -20 °C.

#### **3.3 Planejamento experimental**

Foram elaboradas duas formulações básicas de sorvete, uma contendo mel (mel multifloral de *Apis mellifera* da região de Jequitinhonha-MG, Brasil colhido em janeiro de 2021) e outra com glicose em pó (C2 Alimentos™) e frutose em pó (Lowçucar™) e sacarose (União™) em quantidades semelhantes às encontradas no mel

### 3.4 Elaboração do sorvete

Para a elaboração dos sorvetes, às duas formulações básicas (A e M) (Tabela 1) foram adicionados os demais ingredientes: leite UHT integral (leite Ninho, Nestlé, Brasil); leite em pó integral (Primalato, Brasil); creme (Nestlé™); liga neutra 3G (goma xantana, goma guar e carragena) (Doremus, Brasil); emulsificante mono e diglicerídeo (Duas Rodas, Brasil); aromatizante de creme (Duas Rodas, Brasil) (Tabela 2). Em cada uma dessas duas formulações foram inoculadas culturas probióticas de *B. animalis* subsp. *lactis* (B) e *L. rhamnosus* (L) em culturas axênicas e associadas (LB), totalizando seis tratamentos.

**Tabela 1:** Porcentagem de açúcares de frutose, glicose e sacarose nas formulações A e M

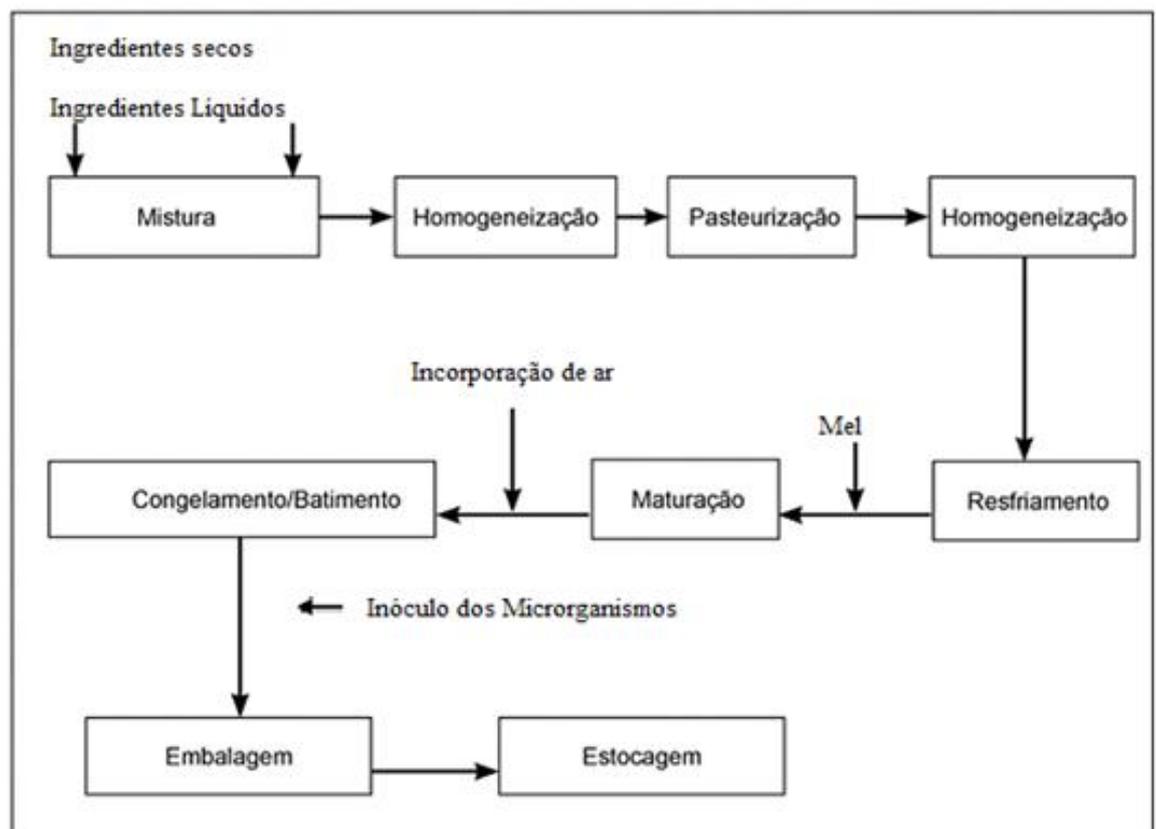
Formulações	
A	Sorvete adicionado de açúcar (5,7% frutose + 4,65% glicose + 0,3% sacarose, totalizando 10,65%)
M	Mel adicionado (15% Mel contendo frutose + glicose + sacarose, totalizando 10,65%)

**Tabela 2:** Formulação das amostras de sorvete, A (Sorvete adicionado de açúcar) e M (Sorvete adicionado de mel).

Composição	A	M
Leite (mL)	2000	2000
Leite em pó (g)	150	150
Creme (g)	100	100
Liga neutra (g)	20	20
Emulsificante de mono e diglicerídeo (g)	20	20
Aromatizante de creme (g)	40	40
Mistura de frutose + glicose + sacarose (g)	280	–
Mel (g)	–	280

Após misturar e homogeneizar os compostos formulados durante 10 min à temperatura ambiente, a mistura resultante foi então pasteurizada a 85°C durante 10 min. A mistura de sorvete foi resfriada até a temperatura de 20°C, e o mel ou a mistura de açúcar estavam se

dissolvendo na mistura. A mistura foi maturada (Bertollo, São Carlos, SP, Brasil) a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  por 2 h. Em seguida, o ar foi incorporado enquanto era batido/congelado em uma máquina de sorvete com capacidade de 20 L (Bertollo, São Carlos, SP, Brasil), na qual a temperatura do sorvete diminuiu para  $-15 \pm 2^\circ\text{C}$ . e a produção continuou até aumentar o volume incorporando 60% de ar. Isso foi monitorado usando o grau de volume marcado na câmara da sorveteira *B. animalis* subsp. *lactis* (B) e *L. rhamnosus* (L) separadamente e associados (LB) foram inoculados para obter cerca de  $10^8$  ufc/g de sorvete misturando usando um misturador de pás. Foram preparados dois litros de sorvete para cada microrganismo ou associação de microrganismo inoculado. O produto foi embalado em recipientes de poliestireno expandido e armazenado a uma temperatura de  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os sorvetes foram envasados em alíquotas de 100mL para padronização das análises futuras. O fluxograma de fabricação do sorvete, segue com algumas adaptações, mas obedecendo às normas de fabricação de gelados comestíveis com base láctea (Figura 1).

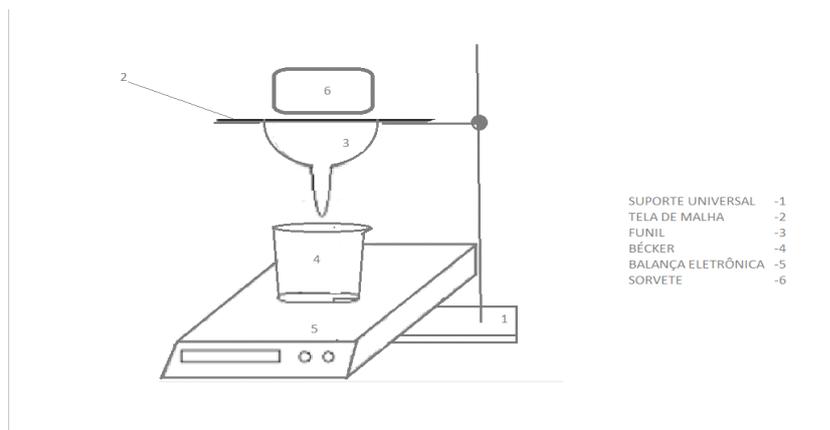


**Figura 1:** Fluxograma de produção do sorvete.

### 3.5 Análises Físicas

### 3.6 Teste de derretimento

O teste foi realizado de acordo com o procedimento, descrito por Granger et al. (2005) com modificações. Amostras de 100 mL de sorvete foram colocadas em congelador (-20 °C) por cerca de 24 h e após isso, transferidas para tela metálica de abertura 0,5 cm, conforme aparato experimental mostrado na Figura 2. A temperatura ambiente foi mantida a  $25 \pm 1$  °C e o volume de sorvete drenado registrado em uma balança a cada 1 minuto. A partir dos dados obtidos, foram construídos gráficos do tempo em função do volume derretido (p/p%). A regressão linear foi utilizada para determinar a taxa de fusão (g/min) de cada sorvete.



**Figura 2:** Aparato utilizado para teste de derretimento de sorvete.

### 3.7 Microscopia

Todas as amostras de sorvete foram analisadas a uma temperatura de 25°C. Com a ponta de uma espátula, as amostras foram coletadas em uma placa e visualizadas em microscópio óptico com aumento de 1000x.

### 3.8 Análise de Overrun

Após a mistura, foi feita a pesagem de um volume de 100 mL em um béquer de 100mL. O mesmo procedimento foi repetido após a etapa de batimento, com o mesmo béquer, determinando-se o overrun após o batimento através da seguinte fórmula:

$$(FIV - IMV) / IMV \times 100,$$

onde FIV = volume de sorvete congelado e IMV = volume inicial de mistura

Para verificar a conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 2005) o overrun no produto final foi confirmado pela medição da massa de 1 L de sorvete.

### **3.9 Análises Microbiológicas**

A qualidade microbiológica das amostras de sorvete foi avaliada visando atender a (IN 60/2019) para gelados comestíveis, que regulamenta a qualidade microbiológica de produtos alimentícios, de acordo com procedimentos estabelecidos pelas normas NBR-ISO: pesquisa de *Salmonella* (NBR-ISO 6579-1, 2021), Estafilococos coagulase positiva (NBR-ISO 6888-1, 2019) e de *Enterobacteriaceae* (NBR-ISO 21528-2, 2017).

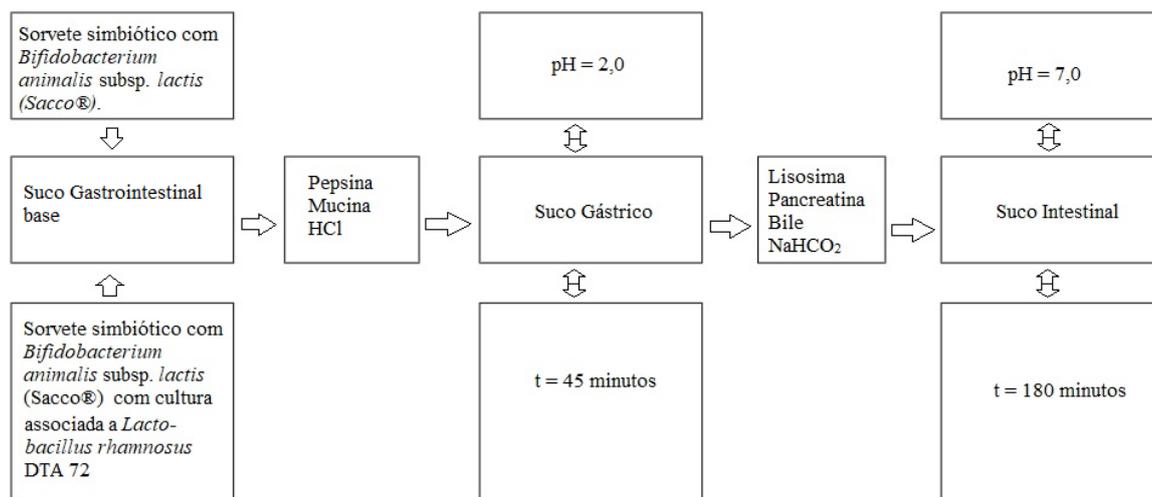
#### **3.9.1 Sobrevivência dos probióticos no sorvete congelado antes e após submeter as condições que mimetizam o trânsito gastrointestinal (GIC)**

A sobrevivência sob condições gastrointestinais *in vitro* foi testada como descrito anteriormente por Favarin et al. (2015) com algumas modificações. O suco gastrointestinal base (GBJ) foi formulado da seguinte da seguinte forma: cloreto de cálcio (0,11 g / l); cloreto de potássio (1,12 g / l), cloreto de sódio (2,0 g / l) e di-hidrogenofosfato de potássio (0,4 g / l). Esta solução foi esterilizada a 121 ° C por 15 minutos.

O suco gástrico artificial (AGJ) foi preparado no momento do uso adicionando ao GBJ, 3,5 g / l de mucina suína (Sigma-Aldrich, S. Louis, Mo, EUA) e 0,26 g / l de pepsina suína (Sigma-Aldrich, S Louis, Mo, EUA). O pH foi ajustado para 2,0 com HCl (1 M). Já o suco intestinal artificial (AIJ) foi obtido pela adição de 3,0 g / l de sal biliar esterilizado por filtração (0,22 µm) (FSL FARMA, Ipanema, BRASIL), 1,95 g / l de pancreatina e 0,1 g / l de clara de ovo lisozima (Sigma-Aldrich, S. Louis, Mo, EUA

Alíquotas de sorvete probiótico (100 µl) foram transferidas para o tubo Eppendorf com 900 µl de AGJ e incubadas em jarra de anaerobiose com atmosfera artificial gerada por sachê (Gaspak EZ, 15% de dióxido de carbono) a 36 ° C por 45 minutos, com agitação suave. Posteriormente, o pH foi neutralizado com solução de bicarbonato de sódio (1 M) e um volume igual de suco intestinal artificial (AIJ) será adicionado ao AGJ. A digestão intestinal simulada continuará com incubação na câmara anaeróbica a 36 ° C por mais 180 minutos, com agitação suave.

Amostras controle foram preparadas (100 µl de sorvete probiótico e 1,9 mL de GBJ). A sobrevivência das bactérias probióticas foi avaliada por contagem em ágar MRS (Sigma-Aldrich, S. Louis, Mo, EUA) adicionado de cisteína (0,05%) antes (amostras controle) e após GIC, incubado por 72 horas a 36 °C.



**Figura 3:** Sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* DTA 72 e de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 em cultura axênica e associados em sorvete..

### 3.10 Análise Sensorial

Foi realizado o teste de aceitação por um painel de 50 consumidores não treinados e selecionados aleatoriamente. Será utilizada uma escala de 9 pontos (1 = desgostei extremamente, 2 = desgostei muito, 3 = desgostei regularmente, 4 = desgostei ligeiramente, 5 = não gostei nem desgostei, 6 = gostei ligeiramente, 7 = gostei regularmente, 8 = gostei muito, 9 = gostei extremamente), para os seguintes parâmetros: Aparência, Textura, Sabor, Derretimento, Residual de Gordura, Doçura, Arenosidade, Avaliação Global. Para o parâmetro intenção de compra, (1 = certamente não compraria, 2 provavelmente não compraria, 3 poderia ou não comprar, 4 provavelmente compraria; 5 = certamente compraria o produto).

### 3.11 Análise Estatística

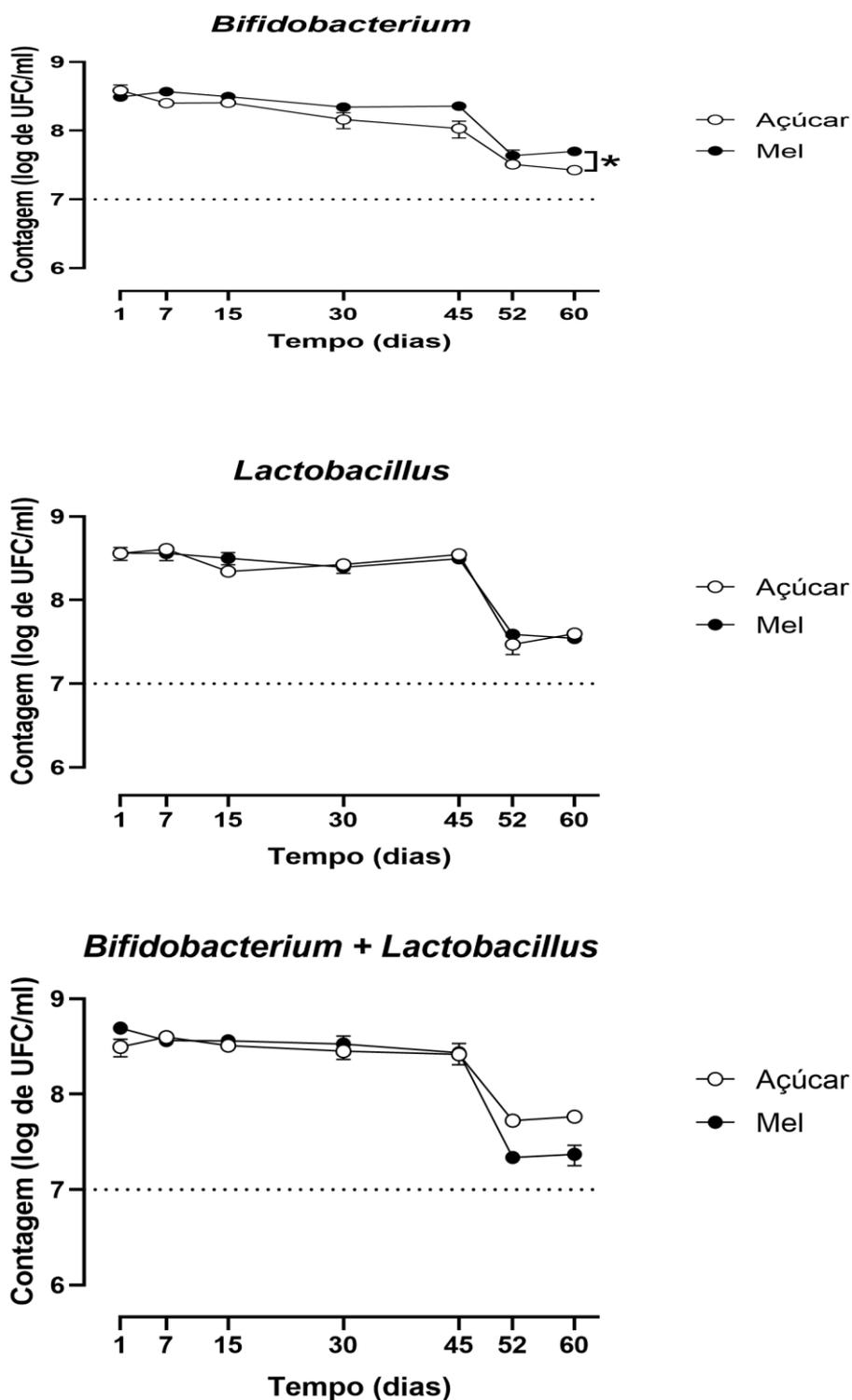
Os dados foram tratados por análise de variância (ANOVA) de uma via para comparações com um único fator de variação. Já para grupos submetidos à interferência simultânea de dois fatores de variação, os dados foram analisados por ANOVA de duas vias. O teste de Tukey a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), foi utilizado para detectar diferenças significativas entre os grupos. O software GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado em todas as análises estatísticas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Viabilidade da cultura probiótica nos sorvetes e após simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.

As contagens referentes a viabilidade das culturas estão mostradas na Figura 4. Verificou-se que não houve redução da viabilidade de ambas as culturas, associadas ou não, nos dois tipos de sorvete ao longo do período de 49 dias. Após 60 dias houve redução de apenas 1 ciclo log em todas as amostras, com contagens em torno de  $10^7$  UFC/g. Entretanto, há que se considerar que ao final do prazo de validade dos produtos, os probióticos ainda precisam sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal. Esta sobrevivência depende do tipo de matriz alimentícia, da utilização de células encapsuladas ou não.

Em relação ao tipo de fonte de carboidrato, a adição de mel ao sorvete reduz a perda de viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 quando comparado ao sorvete adicionado de açúcar. Esse efeito protetor não foi observado na cultura axênica de *Lactobacillus rhamnosus* DTA 72 ou na associação de ambas as culturas probióticas.



**Figura 4:** Viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 e *Lacticaseibacillus rhamnosus* DTA 72 em cultura axênica (A e B) e associados (C) em mel (círculo preto) ou açúcar (círculo branco) adicionados de sorvete durante o armazenamento congelado por até 60 dias. \* representa  $p < 0,05$ .

Segundo GOMES e MALCATA (1999), os produtos fermentados, no momento do consumo devem conter no mínimo  $10^6$ UFC/mL de células probióticas viáveis, uma vez que a

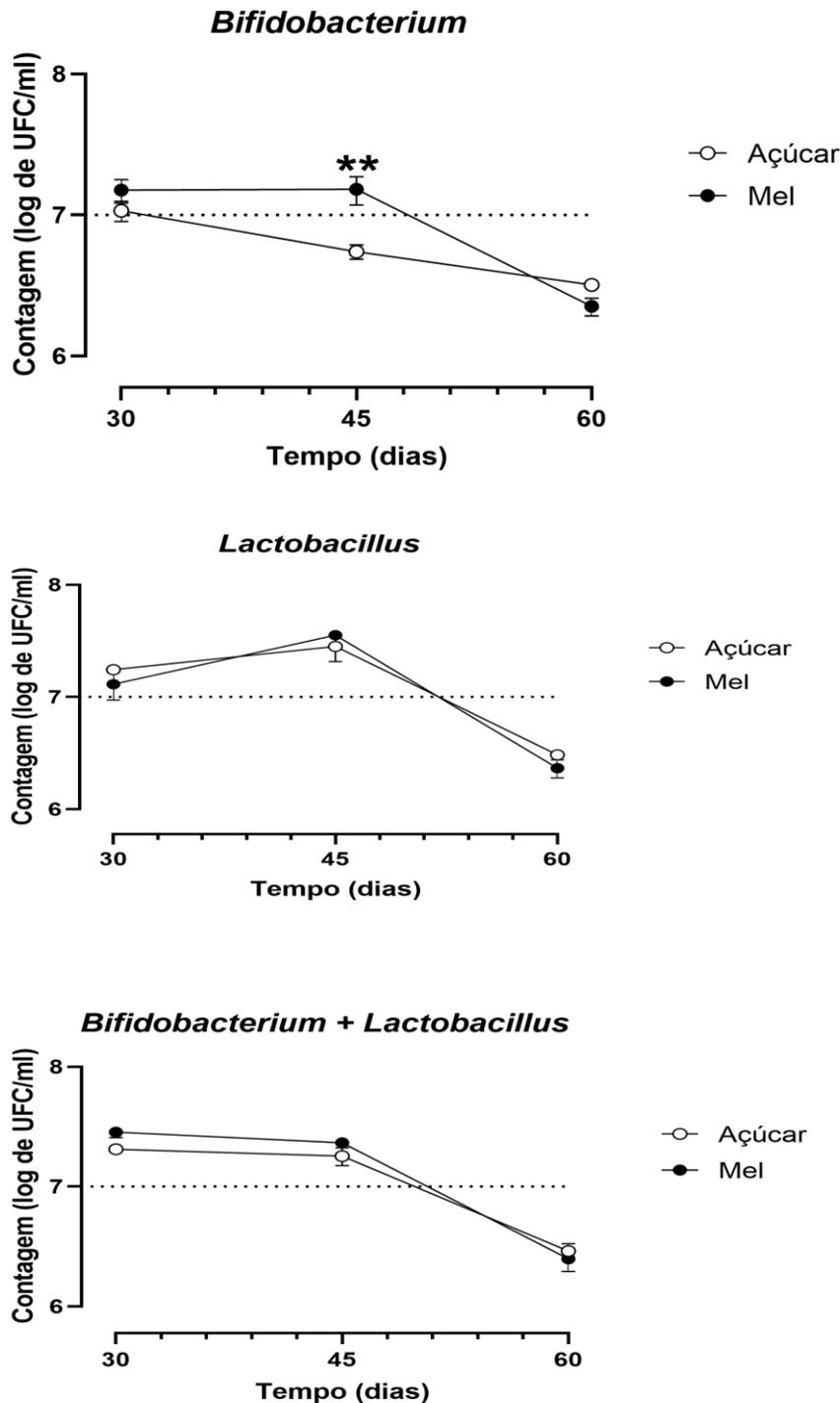
dose mínima terapêutica diária deve ser de  $10^8$ - $10^9$  células viáveis em 100 g do produto fermentado. Entretanto, SANDERS (2008) acredita que a dose de probióticos deve basear-se na eficácia demonstrada em estudos com seres humanos,  $10^6$ UFC/mL ou grama, mas recomendam  $10^8$  UFC/g para compensar a redução por meio de passagem através do trato gastro intestinal.

A legislação brasileira, por meio da Comissão de Assessoramento Técnico-Científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF), recomenda uma porção diária de micro-organismos probióticos viáveis que deve ser ingerida, sendo o mínimo estipulado em  $10^8$  a  $10^9$  UFC de microrganismos por porção diária do produto. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. A documentação referente à comprovação de eficácia deve incluir laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo até o final do prazo de validade e teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares (BRASIL, 2008). Os padrões de identidade e qualidade para leites fermentados (instrução normativa 46 do MAPA, 2007), estabelece contagem mínima de  $10^6$  UFC de bifidobactérias/g.

Os resultados de viabilidade das culturas antes e após simulação de passagem pelo trato gastrointestinal por até 60 dias de armazenamento são mostrados na Figura 5. Todas as amostras apresentaram contagens acima de  $10^6$  UFC/g após passagem simulada pelo trato gastrointestinais, portanto, acima dos valores considerados adequados para um produto probiótico, até o 60º dia de armazenamento. Há uma tendência de estabilidade na perda de viabilidade na cultura associada quando comparada à cultura axênica de *L. rhamnosus*. Em relação ao tipo de fonte de carboidrato, a adição de mel ao sorvete também reduz a perda de viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 quando comparado ao sorvete adicionado de açúcares após simulação de passagem pelo trato gastrointestinal após 45 dias de armazenamento. Esse efeito protetor não foi observado na cultura axênica de *Lacticaseibacillus rhamnosus* DTA 72 ou na associação de ambas as culturas probióticas.

O mel não exerceu efeito prebiótico, para *L. rhamnosus*, não havendo diferença significativa nas contagens do sorvete adicionado de açúcar ou de mel (Figura 5).(CASTRO; DA MOTA SILVA; PRUDÊNCIO DE SOUZA; GUERRA *et al.*, 2021) reportaram ausência de efeito protetor frente a cepas de *Lacticaseibacillus*, especialmente a espécie *L. rhamnosus*, do mel frente a adição de peróxido, que foi atribuído à presença de  $Fe^{2+}$  que ao reagir com  $H_2O_2$  produz radicais hidroxila. Diferentemente, *Bifidobacterium* foi protegida pela presença de mel conforme mostrado na Figura 5. O comparativo entre os tratamentos com mel e com açúcar,

mostra uma mudança de perfil de decréscimo da viabilidade, sugerindo que o mel pode causar uma mudança significativa para a viabilidade da cultura de *B. lactis*.



**Figura 5:** Sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 e *Lactobacillus rhamnosus* DTA 72 em cultura axênica (A e B) e associados (C) em um sorvete de mel (círculo preto) ou açúcar (círculo branco) adicionado após simulação de passagem pelo trato gastrointestinal aos 30, 45 e 60 dias de armazenamento \*\* representa diferença significativa pelo teste de Turkey ( $P < 0,01$ ).

## 4.2 Qualidade higiênico -sanitária dos sorvetes.

Os resultados obtidos nos ensaios de avaliação do perfil higiênico sanitário dos Sorvete (A) e Sorvete (M) (Tabela 6.1) foram correlacionados com os padrões pré-estabelecidos pela legislação brasileira, e atendem os requisitos exigidos na BRASIL (2019)

**Tabela 6.1** Resultado da análise microbiológica do sorve sorvete de creme com mel (M).te de creme com açúcar (glicose e frutose) (A).

Análises	sorvete de creme com açúcar (A).	sorvete de creme com mel (M).	Padrão RDC 331, 2019
<i>Enterobacteriaceae/ g</i>	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
<i>Salmonella</i> sp em 25 g	Ausente	Ausente	Ausente
Estafilococos coag. + / g	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$	$5 \times 10^2$
Coliformes a 45°C/g	7,0	4,0	Não referenciado

UFC= Unidades formadoras de colônia.

A presença de coliformes, termotolerantes e totais, em graus inaceitáveis é um forte indício de uma condição deficiente higiênico-sanitária dos alimentos e que os locais utilizados para a preparação e/ou acondicionamento estão com controle deficitário. Esse é um problema constante no manuseamento de alimentos preparados e por consequência isso influencia na sua vida útil e qualidade (SILVEIRA, 2009).

## 4.3 Análise sensorial

Com uma análise sensorial feita com 50 participantes da região de Duque de Caxias, foram obtidos resultados positivos e significativos de aceitação dos sorvetes (Tabela 6.2).

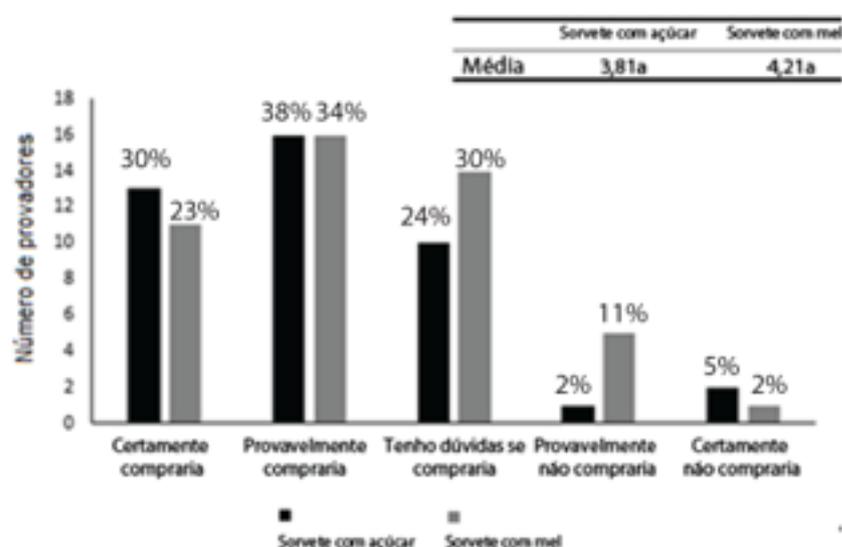
Com relação ao quesito aparência, as amostras de sorvete com mel atingiram uma classificação melhor que as processadas com açúcar, visto que os provadores relataram aspecto brilhoso nestas amostras. Textura, Derretimento e Arenosidade, também foram fatores fundamentais no teste de aceitação para o sorvete com adição de mel, visto que estas amostras obtiveram notas maiores e com diferença estatística significativas.

**Tabela 6.2:** Resultados da análise sensorial de cada quesito em relação às amostras de sorvete com açúcar e o sorvete com mel.

	Sorvete com Açúcar	Sorvete com mel
APARÊNCIA	7,78 <sup>b</sup>	8,83 <sup>a</sup>
TEXTURA	6,88 <sup>b</sup>	8,23 <sup>a</sup>
SABOR	8,45 <sup>a</sup>	7,91 <sup>b</sup>
DERRETIMENTO RESIDUAL DE	7,00 <sup>b</sup>	8,55 <sup>a</sup>
GORDURA	7,89 <sup>a</sup>	7,64 <sup>a</sup>
DOÇURA	8,45 <sup>a</sup>	7,86 <sup>b</sup>
ARENOSIDADE	6,99 <sup>a</sup>	8,11 <sup>a</sup>
AValiação		
GLOBAL	8,01 <sup>a</sup>	8,23 <sup>a</sup>

\*As letras diferentes indicam que há diferença entre as amostras pelo teste de Tukey a 5% de significância

Em outros atributos como Sabor e Doçura, como esperado, o sorvete com açúcar, teve um resultado melhor, sugerindo que realmente o sorvete com mel, tem uma avaliação de ser menos doce que o sorvete feito com açúcar. Isso também é um resultado importante, visto que pelo ponto de vista de saudabilidade, esse fator pode ser valorizado e muito explorado pelo ponto de vista comercial, como um produto menos doce para os consumidores que se restringem ao doce.



**Figura 6:** Intenção de compra de Sorvete de Creme com açúcar e Sorvete de creme com mel.

Não houve diferença significativa entre o sorvete produzido com mel e com os principais açúcares do mel. Além disso o sorvete com mel foi considerado menos doce, portanto, com uma percepção menor de doçura. Porém mesmo assim, se manteve com intenção de compras positiva. Isso pode sugerir uma mudança no padrão de consumo brasileiro que era sempre relacionado a produtos doces, ou mesmo, pode estar relacionado ao fato do produto em estudo comunicar um apelo a saúde com propriedades funcionais e maior valor nutricional, e assim as pessoas esperam que seja um produto menos doce.

## Análises físicas

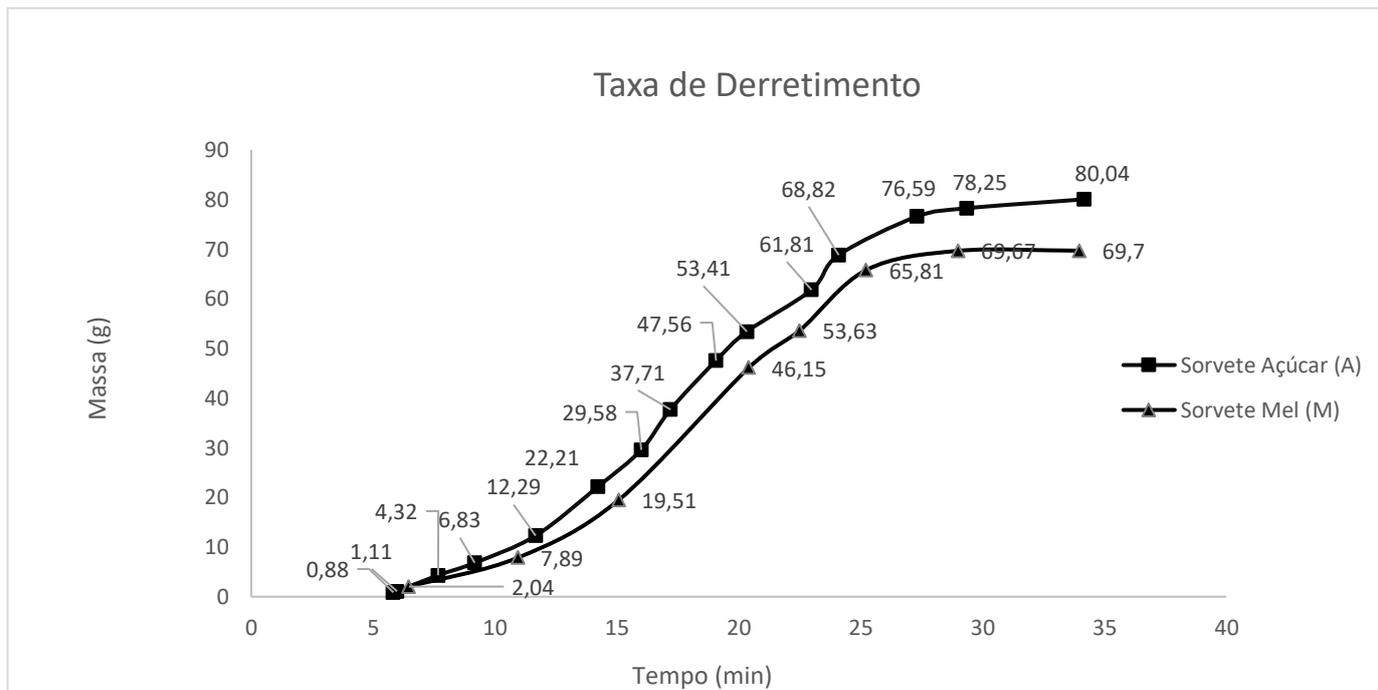
### 4.4 Teste de derretimento

Os testes foram efetuados de maneira equivalente, e com base no ensaio efetuado, foi montada uma tabela de comparação de derretimento entre as amostras dos sorvetes formulados.

A Figura 7 apresenta a curva de derretimento do sorvete com açúcar (A) e do sorvete com mel (M) no qual é possível observar que o derretimento inicial ocorre em 5 minutos para o sorvete (A) e 6 minutos para o sorvete (M) a 25° C. Há uma diferença mínima no derretimento do sorvete (M) em relação ao sorvete (A) mesmo com uma diferença na formulação causada pela substituição do açúcar pelo mel. A maior quantidade de sólidos, muitas vezes representados pela sacarose, causa um abaixamento no ponto de fusão da água, conferindo uma textura mais macia e menor formação de cristais de gelo no produto, gerando um produto mais sensível a troca térmica (SANTOS, 2009).

O sorvete é um produto que abrange diversas fases, no qual bolhas de ar, glóbulos de gordura parcialmente aglutinadas e cristais de gelo estão dispersos em uma solução viscosa ((KOXHOLT; EISENMANN; HINRICHS, 2001)). Eles formam uma estrutura responsável pela cremosidade do sorvete. Alguns aditivos, emulsificantes (mono e di-glicerídeos), estabilizantes (goma xantana, carragena, goma ágar) e até mesmo xarope de glucose, também são responsáveis por favorecer essas ligações, e estabilidade do produto. Durante esse derretimento, dois eventos devem ser evidenciados: o derretimento dos cristais de gelo e a quebra da estrutura emulsionada entre gordura e ar. O derretimento é gerido por diversos fatores, entre eles o *overrun*, a taxa de incorporação de ar da mistura ligações e pontos de fusão lipídicos, tipo e concentração de emulsificante(GOFF, 2018), além do diâmetro dos glóbulos de gordura ((EVERETT; OLSON, 2003; KOXHOLT; EISENMANN; HINRICHS, 2001).

Ademais, o sorvete com mel, obteve uma aceitação melhor que o sorvete com açúcar, e isso pode ter sido causado por conta dos micronutrientes e compostos presentes no mel, favorecendo uma menor taxa de reciclo de cristais de gelo, e uma taxa de derretimento mais tardia que um sorvete contendo apenas os principais açúcares do mel.. Isso é muito interessante no produto desenvolvido, pelo fato o de ser inoculado com bactérias probióticas, cujo estresse por conta da baixa temperatura do sorvete (-20 °C), será menor se o produto estiver mais estável,, Assim sendo pode-se concluir que estas bactérias devam sofrer menos estresse causado por reciclo no tempo de armazenamento, fator esse muito importante na vida de prateleira dos produtos probióticos.



**Figura 7 :** Gráfico de derretimento dos dois tipos de sorvete fabricado.

#### 4.5 Overrun

Foram formulados os sorvetes com açúcares e com méis, nos níveis de 40%, 60%, 80% e 100% de overrun. Overrun de 60% foi o escolhido para o desenvolvimento do sorvete probiótico por apresentar melhor a homogeneização do produto em pré-testes.

O overrun de 60%, nas duas formulações sorvete(A) e sorvete(M), e de acordo com a cartilha de sorvete do (SEBRAE, 2014) utilizada comercialmente no Brasil, caracteriza o produto como sorvete premium.

Ressaltando também que na etapa de fabricação denominada mistura, a incorporação de ar alcançou apenas em torno de 20%. Em contrapartida, quando adentrou a etapa de maturação e de batimento, o sorvete alcançou facilmente a faixa dos 60%, colaborando para uma estrutura de sorvete mais cremosa, e mais leve, suavizando a sensação sensorial de frio.

No entanto, a formulação com 40% de aerção, além de muito densa, e sem uma suavidade adequada, resultou em sensação de arenosidade muito rapidamente, quesito que está intrinsecamente ligado a um defeito. Adicionalmente, acarretaria uma situação de maior estresse para as bactérias probióticas.

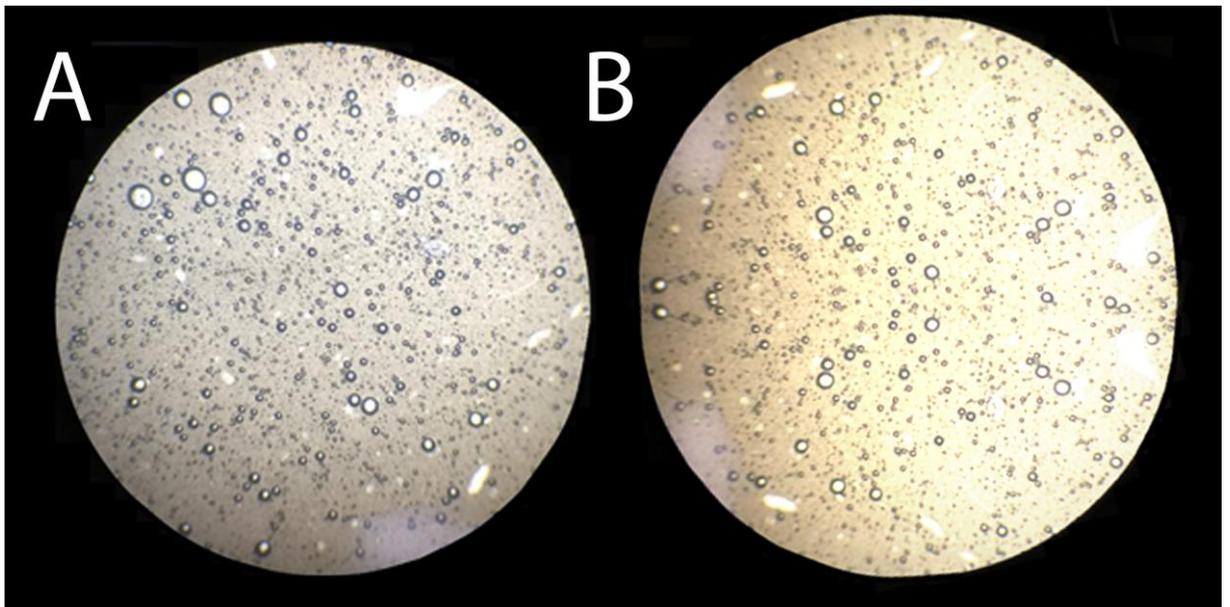
Os níveis de 80% e 100% de incorporação de ar, que por muitas vezes se mostram muito interessantes pelo lado comercial, propriamente pelo aumento de rendimento de produção, se

mostraram muito susceptíveis, a separação de fase com uma oscilação de temperatura, e por conta desse fator se mostrou dificultosa, visto que uma separação de fase, reduzira a homogeneidade, agredindo arduamente os inóculos. Isto em decorrência do fato que uma das fases teria densidade extremamente elevada, desfavorecendo a viabilidade pela pressão osmótica, podendo atingir a parede celular das culturas, e também causar estresse oxidativo por causa da característica anaeróbica das culturas..

Já a formulação de 60%, se mostrou economicamente viável, pelo custo de produção não tão elevado, e com uma característica de emulsão mais estável, isso pode ser ocasionado por conta da formulação do sorvete, não ter como objetivo ser rica em proteína, que são bons compostos emulsionantes, e possivelmente por conta desse fator a formulação com 60% de ar se mostrou mais estável que a mesma formulação com 80% e 100% de overrun.

Portanto a formulação com 60% de overrun foi a determinada como o padrão para todos as amostras do presente trabalho.

#### 4.6 Microscopia

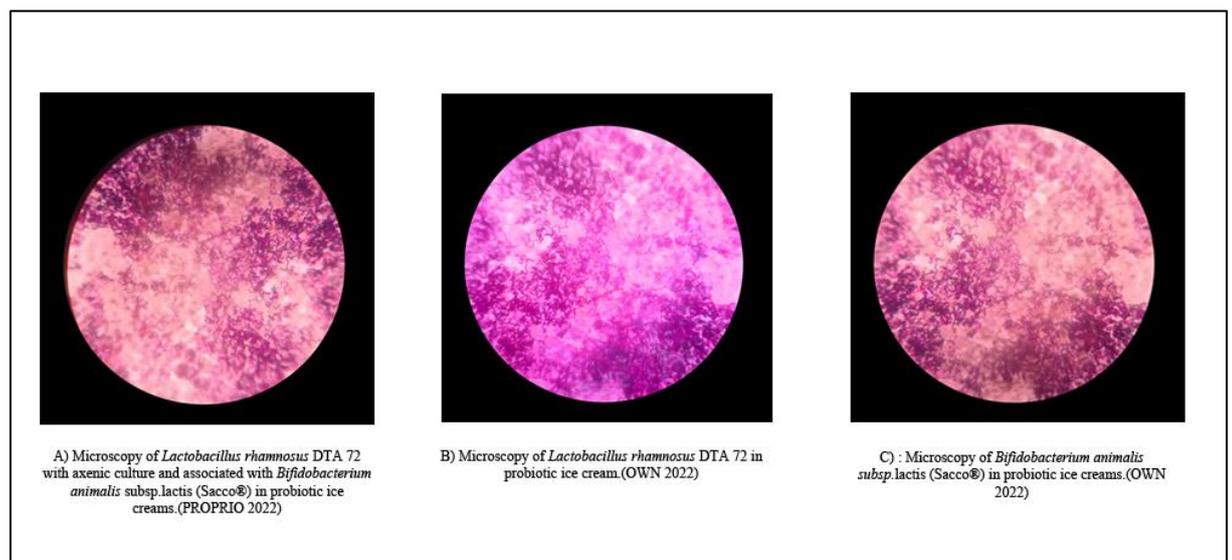


**Figura 8:** Microscopia de amostras dos produtos inoculados , sorvete de creme com açúcares frutose, glicose e sacarose simulando quantidades encontradas no mel (A) e sorvete de creme com mel (B).

Uma característica observada a partir da microscopia do produto, é que os sorvetes, com mesmo balanço de formulação e procedimento fabril, geraram produtos com algumas diferenças físicas. Uma delas é a conformação das bolhas de ar nas imagens A (sorvete de creme

com açúcar) e B (sorvete de creme com mel). Pode-se observar a presença de bolhas com diâmetro maior em todas as capturas de imagens microscópicas do sorvete com açúcar, enquanto o sorvete com mel (B), por mais que contenha algumas formações de bolhas maiores, nos vários ensaios, foi constatada uma uniformidade maior.

Posteriormente em um pré-teste de formação de bola do sorvete, o sorvete com base de mel mostrou uma emulsão aparentemente mais uniforme, com um boleamento mais brilhoso e menos quebradiço, o que é um indício de uma emulsão mais estruturada.



**Figura 9:** Microscopia das amostras de sorvetes inoculados com *Bifidobacterium animalis* subsp.lactis (Sacco®), *Lactobacillus rhamnosus* DTA 72 e *Bifidobacterium animalis* subsp.lactis (Sacco®) associado a *Lactobacillus rhamnosus* DTA 72.

#### **4.7 Potencialidades do produto para sua migração da academia para o mercado consumidor**

O projeto comercial consiste de uma implantação no processo fabril padrão já existente. Será interessante o uso de um misturador com pás grandes, no entanto de baixa rotação, focando em uma baixa tensão de cisalhamento empregada sobre as culturas, para mistura a cultura na mistura, minimizando a perda de viabilidade, aumentando a homogeneidade e sem perder o rendimento, visto que o overrun se mostrou muito importante na viabilidade da bactéria em pré testes.

Outro fator importante a ser considerado, é que segundo a empresa parceira de produção das nossas amostras o aumento no custo pelo uso do mel, girou em torno de 15% de aumento por conta da matéria prima. Já na implementação da etapa de mistura da cultura na base pronta, por necessitar de um equipamento com agitador com área de contato grande e baixa rotação, além de sistema de refrigeração para a manutenção da temperatura do produto. O custo ficaria em torno de 12% maior na da produção inicial.

Além disso existe o custo das culturas, então o custo geral de produção desse sorvete em relação ao sorvete tradicional que já é comercializado no país, seria aumentado em cerca de 27%, fora o custo da cultura, logo a forma de exposição seria escolhida uma condição de porção unitária visando uma facilitação da barreira de entrada dos consumidores que se mostram com possibilidades de compra, que são consumidores presentes na fatia do mercado segundo o teste de intenção de compras, mas que tem uma grande possibilidade de aceitação.

Esse resultado mostra a grande oportunidade de estudo do custo e da viabilidade do uso de microencapsulação das culturas nessa matriz, visto que pode significar a redução dessa etapa a mais, e por consequência uma redução de 12% ao menos do custo de produção.

Todos esses fatores têm o potencial de serem explorados com a alta de produtos light, inclusive de gelados comestíveis, que podem ser interligados a outros produtos, como cereais e frutas, para o aumento de saudabilidade do consumidor.

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve êxito no avanço do estudo e manipulação de probióticos em sorvetes, com o resultado positivo de alcançar elevada manutenção da sobrevivência das cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Lactiseibacillus rhamnosus* DTA 72 mesmo após passagem simulada pelo trato gastrointestinal,.

Outro fator importante é a escolha das cepas para as diferentes matrizes alimentícias e possíveis interações mutualistas entre elas. Neste estudo o mel exerceu efeito protetor para a cultura de *B. animalis* subsp. *lactis*, mas não em relação a *L. rhamnosus*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAPA, S.; DINGELDEIN, H.; SCHMIDT, K.; HERALD, T. Rheological properties of ice cream mixes and frozen ice creams containing fat and fat replacers. **Journal of dairy science**, 83, n. 10, p. 2224-2229, 2000.

ALQARNI, A. S.; OWAYSS, A. A.; MAHMOUD, A. A.; HANNAN, M. A. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**, 18, n. 5, p. 618-625, 2014.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GASPARRINI, M.; FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y.; MAZZONI, L. *et al.* The composition and biological activity of honey: a focus on Manuka honey. **Foods**, 3, n. 3, p. 420-432, 2014.

ALZHRANI, H. A.; BOUKRAË, L.; YUVA BELLIK, F. A.; BAKHOTMAH, B. A. *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of three varieties of honey from different botanical and geographical origins. **Global journal of health science**, 4, n. 6, p. 191, 2012.

ARELLANO, J. L. P. **Sisinio de Castro. Manual de patología general.** Elsevier Health Sciences, 2013. 8445825119.

ASTRUP, A. Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies. **The American journal of clinical nutrition**, 99, n. 5, p. 1235S-1242S, 2014.

BEDANI, R.; ROSSI, E. Microbiota intestinal e probióticos: implicações sobre o câncer de cólon. **Jornal Português de gastroenterologia**, 16, n. 1, p. 19-28, 2009.

BENDINI, J. d. N.; SOUZA, D. C. Caracterização físico-química do mel de abelhas proveniente da florada do cajueiro. **Ciência Rural**, 38, p. 565-567, 2008.

BITTENCOURT, J. V. M. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA NA PRODUÇÃO DE GELADOS COMESTÍVEIS. **Revista Nutrir-ISSN 2358-2669**, 1, n. 4, 2016.

BONTÉ, F.; DESMOULIÈRE, A. Le miel: origine et composition. **Actualités pharmaceutiques**, 52, n. 531, p. 18-21, 2013.

BORIS, S.; SUAREZ, J.; BARBES, C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, avaginal isolate. **Journal of applied microbiology**, 83, n. 4, p. 413-420, 1997.

BOURLIOUX, P.; KOLETZKO, B.; GUARNER, F.; BRAESCO, V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. **The American journal of clinical nutrition**, 78, n. 4, p. 675-683, 2003.

BRASIL, R. D. D. C. R. ANVISA - RDC Nº 266, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005 2005.

BRASIL, R. D. D. C. R. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 2, de 07 de Janeiro de 2002-Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde e IX- Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas (atualizado Julho/2008). . 2008.

BRASIL, R. D. D. C. R. ANVISA RESOLUÇÃO - RDC Nº 331, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019 Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. 2019.

CAMARGO, R. C. R. d.; OLIVEIRA, K. L. d.; BERTO, M. I. Mel de abelhas sem ferrão: proposta de regulamentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, 20, 2017.

CAMPANARO, S.; TREU, L.; VENDRAMIN, V.; BOVO, B. *et al.* Metagenomic analysis of the microbial community in fermented grape marc reveals that *Lactobacillus fabifermentans* is one of the dominant species: insights into its genome structure. **Applied microbiology and biotechnology**, 98, n. 13, p. 6015-6037, 2014.

CASTRO, V. M. R.; DA MOTA SILVA, M.; PRUDÊNCIO DE SOUZA, E. R.; GUERRA, A. F. *et al.* Role of milk and honey in the tolerance of lactobacilli to oxidative stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, 52, n. 2, p. 883-893, 2021/06/01 2021.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, 45, n. 1, p. 61-84, 2005.

CHERCHI, A.; SPANEDDA, L.; TUBEROSO, C.; CABRAS, P. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. **Journal of Chromatography A**, 669, n. 1-2, p. 59-64, 1994.

CODEX. Codex standard 12. **Revised Codex Standard for Honey, Standards and Standard Methods**, 11, p. 1-7, 2001.

COLAGIORGI, A.; TURRONI, F.; MANCABELLI, L.; SERAFINI, F. *et al.* Insights into teichoic acid biosynthesis by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. **FEMS microbiology letters**, 362, n. 17, 2015.

DA SILVA, F. M. B.; DE OLIVEIRA, S. M. J. V.; NOBRE, M. R. C. A randomised controlled trial evaluating the effect of immersion bath on labour pain. **Midwifery**, 25, n. 3, p. 286-294, 2009.

DA SILVA, P. D. L.; DE FÁTIMA BEZERRA, M.; DOS SANTOS, K. M. O.; CORREIA, R. T. P. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. **LWT-Food Science and Technology**, 62, n. 1, p. 452-457, 2015.

DE LA FUENTE, E.; RUIZ-MATUTE, A.; VALENCIA-BARRERA, R.; SANZ, J. *et al.* Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. **Food chemistry**, 129, n. 4, p. 1483-1489, 2011.

DE MELO, F. H. C.; MENEZES, F. N. D. D.; DE SOUSA, J. M. B.; DOS SANTOS LIMA, M. *et al.* Prebiotic activity of monofloral honeys produced by stingless bees in the semi-arid region of Brazilian Northeastern toward *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Bifidobacterium lactis* BB-12. **Food Research International**, 128, p. 108809, 2020.

DEMIRCI, T.; AKTAŞ, K.; SÖZERI, D.; ÖZTÜRK, H. İ. *et al.* Rice bran improve probiotic viability in yoghurt and provide added antioxidative benefits. **Journal of Functional Foods**, 36, p. 396-403, 2017.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. d. M.; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia**, 47, n. 1, p. 93-98, 2010.

DI CRISCIO, T.; FRATIANNI, A.; MIGNOGNA, R.; CINQUANTA, L. *et al.* Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. **Journal of dairy science**, 93, n. 10, p. 4555-4564, 2010.

DI GIROLAMO, F.; D'AMATO, A.; RIGHETTI, P. G. Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. **Journal of proteomics**, 75, n. 12, p. 3688-3693, 2012.

DOS SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista científica do ITPAC**, 4, n. 1, p. 40-49, 2011.

EL-SAYED, H. S.; SALAMA, H. H.; EL-SAYED, S. M. Production of synbiotic ice cream. **Int J ChemTech Res**, 7, p. 138-147, 2014.

ERKAYA, T.; DAĞDEMİR, E.; ŞENGÜL, M. Influence of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) addition on the chemical and sensory characteristics and mineral concentrations of ice cream. **Food Research International**, 45, n. 1, p. 331-335, 2012.

ESCUREDO, O.; DOBRE, I.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; SEIJO, M. C. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **Food chemistry**, 149, p. 84-90, 2014.

ESCUREDO, O.; MÍGUEZ, M.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; SEIJO, M. C. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food chemistry**, 138, n. 2-3, p. 851-856, 2013.

EVERETT, D.; OLSON, N. Free oil and rheology of Cheddar cheese containing fat globules stabilized with different proteins. **Journal of dairy science**, 86, n. 3, p. 755-763, 2003.

FAVARIN, L.; LAUREANO-MELO, R.; LUCHESE, R. H. Survival of free and microencapsulated *Bifidobacterium*: effect of honey addition. **Journal of microencapsulation**, 32, n. 4, p. 329-335, 2015.

FERRARIO, C.; TAVERNITI, V.; MILANI, C.; FIORE, W. *et al.* Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. **The Journal of nutrition**, 144, n. 11, p. 1787-1796, 2014.

FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y.; GIAMPIERI, F.; GASPARRINI, M.; MAZZONI, L. *et al.* The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, 68, p. 154-182, 2014.

FULLER, R. Probiotics: an overview. *In*: **Human Health**: Springer, 1994. p. 63-73.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R. A. *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition research reviews**, 17, n. 2, p. 259-275, 2004.

GOFF, H.; KINSELLA, J.; JORDAN, W. Influence of various milk protein isolates on ice cream emulsion stability. **Journal of Dairy Science**, 72, n. 2, p. 385-397, 1989.

GOFF, H. D. Ice cream. *In*: **Lipid Technologies and Applications**: Routledge, 2018. p. 329-354.

GOFF, H. D.; HARTEL, R. W. **Ice cream**. Springer Science & Business Media, 2013. 1461460964.

GOFF, J. A.; JORDAN, T. H. Stochastic modeling of seafloor morphology: A parameterized Gaussian model. **Geophysical Research Letters**, 16, n. 1, p. 45-48, 1989.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, 10, n. 4, p. 139-157, 1999/04/01/ 1999.

GUO, Z.; LIU, X.; ZHANG, Q.; SHEN, Z. *et al.* Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: a meta-analysis of randomised controlled trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, 21, n. 11, p. 844-850, 2011.

HENRIQUES, A.; JACKSON, S.; COOPER, R.; BURTON, N. Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 58, n. 4, p. 773-777, 2006.

HERMOSÍN, I.; CHICON, R. M.; CABEZUDO, M. D. Free amino acid composition and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, 83, n. 2, p. 263-268, 2003.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.; YARMAND, M. *et al.* Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food chemistry**, 111, n. 1, p. 50-55, 2008.

IGLESIAS, M. T.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; POLO, M. C.; DE LORENZO, C. *et al.* Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54, n. 24, p. 9099-9104, 2006.

IN 11/2000, I. N. Instrução Normativa Nº 11, de 20 de Outubro de 2000 - RTIQ Mel completo - IN 11/2000. 2000.

IN 60/2019, I. N. ANVISA Nº 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019. 2019.

IRWIN, C.; KHALESİ, S.; COX, A. J.; GRANT, G. *et al.* Effect of 8-weeks prebiotics/probiotics supplementation on alcohol metabolism and blood biomarkers of healthy adults: a pilot study. **European journal of nutrition**, 57, n. 4, p. 1523-1534, 2018.

JOINT, F. WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: London. **Ontario, Canada**, 2002.

KAMAL, M. A.; KLEIN, P. Determination of sugars in honey by liquid chromatography. **Saudi journal of biological sciences**, 18, n. 1, p. 17-21, 2011.

KEČKEŠ, J.; TRIFKOVIĆ, J.; ANDRIĆ, F.; JOVETIĆ, M. *et al.* Amino acids profile of Serbian unifloral honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 93, n. 13, p. 3368-3376, 2013.

KHALESİ, S.; SUN, J.; BUYS, N.; JAYASINGHE, R. Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. **Hypertension**, 64, n. 4, p. 897-903, 2014.

KIM, H.-J.; LEE, H. J.; LIM, B.; KIM, E. *et al.* Lactobacillus terrae sp. nov., a novel species isolated from soil samples in the Republic of Korea. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 68, n. 9, p. 2906-2911, 2018.

KOXHOLT, M. M.; EISENMANN, B.; HINRICHS, J. Effect of the fat globule sizes on the meltdown of ice cream. **Journal of Dairy Science**, 84, n. 1, p. 31-37, 2001.

MACEDO, L. N.; LUCHESE, R. H.; GUERRA, A. F.; BARBOSA, C. G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Food Science and Technology**, 28, n. 4, p. 935-942, 2008.

MACHADO, A. d. S. Importância da microbiota intestinal para a saúde humana, enfocando nutrição, probiótico e disbiose. **Monografia (especialização)-Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte**, 2008.

MACHADO DE-MELO, A. A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. d.; SANCHO, M. T.; PASCUAL-MATÉ, A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. **Journal of Apicultural Research**, 57, n. 1, p. 5-37, 2018.

MAIA, P. L.; DE CERQUEIRA FIORIO, B.; DA SILVA, F. R. A influência da microbiota intestinal na prevenção do câncer de cólon. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, 47, n. 1, p. 182-197, 2018.

MARQUES, L. J. P.; MUNIZ, F. H.; LOPES, G. d. S.; SILVA, J. M. Levantamento da flora apícola em Santa Luzia do Paruá, Sudoeste da Amazônia, Maranhão. **Acta Botanica Brasilica**, 25, p. 141-149, 2011.

MARTINEZ, O. A.; SOARES, A. E. E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 13, p. 982-990, 2012.

MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M. T. Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54, n. 5, p. 1541-1550, 2006.

MCFARLAND, L. V. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, 60, n. suppl\_2, p. S85-S90, 2015.

MILLETTE, M.; NGUYEN, A.; AMINE, K. M.; LACROIX, M. Gastrointestinal survival of bacteria in commercial probiotic products. **International Journal of Probiotics & Prebiotics**, 8, n. 4, p. 149, 2013.

MIZOCK, B. A. Probiotics. **Disease-a-month: DM**, 61, n. 7, p. 259-290, 2015.

MOREIRA, R. F.; DE MARIA, C. A.; PIETROLUONGO, M.; TRUGO, L. C. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. **Food Chemistry**, 121, n. 3, p. 697-704, 2010.

MOSQUIM, M. C. A. **Fabricando sorvetes com qualidade: Maria Cristina Alvarenga Mosquim**. Fonte Comunicações e Editora, 1999.

NAGPAL, R.; MAINALI, R.; AHMADI, S.; WANG, S. *et al.* Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. **Nutrition and healthy aging**, 4, n. 4, p. 267-285, 2018.

NBR-ISO 6579-1, I. O. f. S. Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal — Método horizontal para detecção, enumeração e sorotipagem de *Salmonella*. 2021.

NBR-ISO 6888-1, I. O. f. S. Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal — Método horizontal para enumeração de estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies) - Parte 1: Técnica usando ágar Baird-Parker. 2019.

NBR-ISO 21528-2, I. O. f. S. microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection and enumeration 2017.

NIKBAKHT, E.; KHALESI, S.; SINGH, I.; WILLIAMS, L. T. *et al.* Effect of probiotics and synbiotics on blood glucose: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. **European journal of nutrition**, 57, n. 1, p. 95-106, 2018.

NIKBAKHT NASRABADI, E.; JAMALUDDIN, R.; ABDUL MUTALIB, M.; KHAZA'AI, H. *et al.* Reduction of aflatoxin level in aflatoxin-induced rats by the activity of probiotic *Lactobacillus casei* strain S hirotá. **Journal of applied microbiology**, 114, n. 5, p. 1507-1515, 2013.

NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; GÓMEZ, L. A.; HIGES, M. *et al.* Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. **Apidologie**, 34, n. 2, p. 181-188, 2003.

OLIVEIRA, I. B. d. Condições higiênico-sanitárias do mel de abelha (*Apis mellifera*) comercializado na microrregião sertaneja da Paraíba. 2018.

ORDOÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, L.; SANZ, M. *et al.* Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos. **Porto Alegre: Artmed**, 1, p. 203204, 2005.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E., 2013, **M. Antonie van Leeuwenhoek 82: 279-289, 2002. R© 2002 Kluwer Academic Publishers. 279.** Springer Science & Business Media. 279.

PEARSON, A. Book Review| Ice Cream 3rd Edition, Arbuckle WS (Ed.), AVI Publishing Co., Westport, Conn.(1977), USA 517 pp. \$22.00 US, \$23.00 other countries. : Elsevier 1978.

POGAČIĆ, T.; SAMARŽIJA, D.; CORICH, V.; D'ANDREA, M. *et al.* Microbiota of Karakačanski skakutanac, an artisanal fresh sheep cheese studied by culture-independent PCR-ARDRA and PCR-DGGE. **Dairy science & technology**, 90, n. 4, p. 461-468, 2010.

PUSCAS, A.; HOSU, A.; CIMPOIU, C. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. **Journal of Chromatography A**, 1272, p. 132-135, 2013.

REBANE, R.; HERODES, K. A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. **Analytica chimica acta**, 672, n. 1-2, p. 79-84, 2010.

REGAND, A.; GOFF, H. D. Structure and ice recrystallization in frozen stabilized ice cream model systems. **Food hydrocolloids**, 17, n. 1, p. 95-102, 2003.

REZAC, S.; KOK, C. R.; HEERMANN, M.; HUTKINS, R. Fermented foods as a dietary source of live organisms. **Frontiers in microbiology**, 9, 2018.

ROSSETO, L. A.; PIRES, M. E. L.; MELCHIOR, A. C. B.; BOSQUESI, P. L. *et al.* Synthesis and preliminary evaluation of N-oxide derivatives for the prevention of atherothrombotic events. **Molecules**, 20, n. 10, p. 18185-18200, 2015.

RUSIG, A.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. Tela excludora de rainha na produção de mel e na longevidade das operárias em colmeias de *Apis mellifera*. **Ciência Rural**, 32, p. 329-334, 2002.

RYBAK-CHMIELEWSKA, H. Changes in the carbohydrate composition of honey undergoing during storage. **Journal of Apicultural Science**, 1, n. 51, 2007.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MÄTTÖ, J. *et al.* Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of biotechnology**, 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SABATINI, A. G.; MARCAZZAN, G. L.; CABONI, M. F.; BOGDANOV, S. *et al.* Quality and standardisation of royal jelly. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, 1, n. 1, p. 1-6, 2009.

SAK-BOSNAR, M.; SAKAČ, N. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. **Food chemistry**, 135, n. 2, p. 827-831, 2012.

SANDERS, M. E. Use of Probiotics and Yogurts in Maintenance of Health. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 42, 2008.

SANTOS, G. G. SORVETE. Processamento, tecnologia e substitutos de sacarose. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, 13, n. 2, p. 95-109, 2009.

SAXELIN, M.; TYNKKYNNEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T.; DE VOS, W. M. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Current opinion in biotechnology**, 16, n. 2, p. 204-211, 2005.

SEBRAE, S. B. d. A. à. M. e. P. E. CARTILHA DE SORVETE. [pa.sebrae.com.br/cartilhasorvete](http://pa.sebrae.com.br/cartilhasorvete) : acesso 20 de fevereiro de 2022, 2014.

SILVEIRA, A. M. Avaliação de peitos e fígados de frango de corte com lesões suspeitas de aflatoxicose. 2009.

SILVEIRA, R.; JESUS, W.; VIANA, C.; SILVA, M. Melhores rainhas de *Apis mellifera* são obtidas usando menores níveis de diluição de geléia real e com menor idade: uma revisão Best queens of *Apis mellifera* are obtained using minor dilution levels of royal jelly and lower age: a review. 2019.

SOUZA, B. d. A.; MARCHINI, L. C.; DIAS, C. T. d. S.; ODA-SOUZA, M. *et al.* Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. **Food Science and Technology**, 29, p. 798-802, 2009.

SOUZA, J. C. B.; COSTA, M. d. R.; DE RENSIS, C. M. V. B.; SIVIERI, K. Sorvete: composição, processamento e viabilidade da adição de probiótico Ice cream: composition, processing and addition of probiotic. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, 21, n. 1, p. 155-165, 2010.

SUN-WATERHOUSE, D.; EDMONDS, L.; WADHWA, S.; WIBISONO, R. Producing ice cream using a substantial amount of juice from kiwifruit with green, gold or red flesh. **Food Research International**, 50, n. 2, p. 647-656, 2013.

SUN-WATERHOUSE, D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, 46, n. 5, p. 899-920, 2011.

SUN, J.; BUYS, N. Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Annals of medicine**, 47, n. 6, p. 430-440, 2015.

SUN, J.; BUYS, N. J. Glucose-and glycaemic factor-lowering effects of probiotics on diabetes: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. **British Journal of Nutrition**, 115, n. 7, p. 1167-1177, 2016.

SWAGERTY, D. L.; WALLING, A. D.; KLEIN, R. M. Lactose intolerance. **American family physician**, 65, n. 9, p. 1845-1860, 2002.

THORNING, T. K.; BERTRAM, H. C.; BONJOUR, J.-P.; DE GROOT, L. *et al.* Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: current evidence and knowledge gaps. **The American journal of clinical nutrition**, 105, n. 5, p. 1033-1045, 2017.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, 474, n. 11, p. 1823-1836, 2017.

TORNUK, F.; KARAMAN, S.; OZTURK, I.; TOKER, O. S. *et al.* Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. **Industrial Crops and Products**, 46, p. 124-131, 2013.

VAN KLEEF, E.; VAN TRIJP, H. C.; LUNING, P.; JONGEN, W. M. Consumer-oriented functional food development: how well do functional disciplines reflect the 'voice of the consumer'? **Trends in Food Science & Technology**, 13, n. 3, p. 93-101, 2002.

VILLALVA, F. J.; CRAVERO BRUNERI, A. P.; VINDEROLA, G.; GONCALVEZ DE OLIVEIRA, E. *et al.* Formulation of a peach ice cream as potential symbiotic food. **Food Science and Technology**, 37, n. 3, p. 456-461, 2017.

WAITZBERG, D. L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica v. 1. *In: Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica v. 1*, 2009. p. 1289-1289.

WON, S.-R.; LEE, D.-C.; KO, S. H.; KIM, J.-W. *et al.* Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. **Food Research International**, 41, n. 10, p. 952-956, 2008.

WON, S.-R.; LI, C.-Y.; KIM, J.-W.; RHEE, H.-I. Immunological characterization of honey major protein and its application. **Food Chemistry**, 113, n. 4, p. 1334-1338, 2009.