



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

PAULO TERUMITSU SAITO

**ELABORAÇÃO DE SORVETE FUNCIONAL À BASE DE
ISOLADO PROTÉICO DE SORO FERMENTADO COM *KEFIR***

PAULO TERUMITSU SAITO

**ELABORAÇÃO DE SORVETE FUNCIONAL À BASE DE
ISOLADO PROTÉICO DE SORO FERMENTADO COM *KEFIR***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dra. Sandra Garcia.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Saito, Paulo Terumitsu.

Elaboração de sorvete funcional à base de isolado protéico de soro fermentado com Kefir / Paulo Terumitsu Saito. - Londrina, 2016.
130 f.

Orientador: Profª Drª Sandra Garcia Profª Drª Sandra Helena Prudencio.
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2016.
Inclui bibliografia.

1. sobremesa láctea - Teses. 2. isolado protéico de soro - Teses. 3. grãos de Kefir - Teses. 4. baixo teor de gordura - Teses. I. Profª Drª Sandra Helena Prudencio, Profª Drª Sandra Garcia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

PAULO TERUMITSU SAITO

**ELABORAÇÃO DE SORVETE FUNCIONAL À BASE DE ISOLADO
PROTÉICO DE SORO FERMENTADO COM *KEFIR***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof Dr^a. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a Marly Sayuri Katsuda
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof. Dr^a Mirian Cristina Maretti
Universidade Filadélfia - UEL

Londrina, 25 de junho de 2016.

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais Paulo e Kimiko. Todo o ensinamento sobre dedicação, coragem, persistência foram fundamentais nesta etapa, adquirindo novos conhecimentos e muitas coisas de querer aprender, e certamente virá inúmeras conquistas futuras

AGRADECIMENTO (S)

Primeiramente, agradeço a Deus pela saúde, oportunidade, disposição, persistência e capacidade para realizar esta pesquisa.

Ao longo caminho percorrido até a concretização deste trabalho, muitas pessoas, direta ou indiretamente, contribuíram muito para o sucesso deste grande aprendizado e investimento de vida.

Agradeço a minha família, meu pai e minha mãe, pelo grande amor, apoio e incentivo incondicional prestados.

Agradeço a minha orientadora, professora Dr.^a Sandra Garcia, pelo incentivo, amizade e pela dedicação em estar sempre pronta a me orientar e obter um grande aprendizado na vida.

A professora Dr.^a Luciana Furlaneto e a doutoranda Márcia Regina Terra que sempre estiveram dispostas a me ajudar e colaborar na orientação da extração de DNA, PCR e sequenciamento.

A professora Dr.^a Marly Sayuri Katsuda pela obtenção dos grãos de *Kefir*, orientação na formulação e processamento dos sorvetes.

Ao casal professor Dr. Cláudio Takeo Ueno e a professora Dr.^a Lyssa Setsuko Sakanaka pelas sugestões do uso de diferentes ingredientes alimentares e me auxiliar na análise sensorial

Aos meus amigos Katri Gasparin, Marli Busanello, Karla Guergoletto, Talita Kato, Marsilvio Filho, Alessandra Bosso, que sempre me apoiaram, me deram conselhos e auxílio, pelos bons momentos que passamos, e pela amizade que construímos.

Aos meus companheiros de mestrado, pela ajuda mútua nos momentos mais difíceis, pelas sugestões, críticas, auxílios sempre quando necessitei.

Aos meus companheiros de Kendo, sempre auxiliavam na avaliação nos testes preliminares no desenvolvimento dos sorvetes.

A Metachem pela doação da inulina e CMC, a empresa TOVANI pela doação da sucralose, polidextrose e maltitol, a empresa Cargill pela doação da eritritol.

Meus agradecimentos também devem ser dados à CAPES, pelo incentivo à pesquisa brasileira através da bolsa de estudos.

Talvez não haja nenhuma prática mais difícil do que a da continuidade. Todavia, se desafiarmos para realizá-la um pouquinho mais cada dia, sem perceber teremos construído um caminho para a felicidade nas profundezas de nossa vida;

Ikeda Daisaku

SAITO, Paulo Terumitsu. **Elaboração de sorvete funcional à base de isolado protéico de soro fermentado com *Kefir***. 2016. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Diversos benefícios à saúde e a conscientização dos consumidores por probióticos e ingredientes funcionais como o soro protéico tem atraído o interesse no desenvolvimento e comercialização de produtos, como o *Kefir*, que possui características funcionais. Dentre os benefícios atribuídos ao *Kefir*, estudos relatam que as bactérias ácido-láticas (BAL) dos grãos do *Kefir* produzem bacteriocinas, e o polissacarídeo *Kefiran*, substâncias que têm sido responsabilizadas por suas propriedades antimicrobianas. O soro protéico por outro lado pode ser usado como substituto de gordura, que contém proteínas de fácil digestão, ricas em aminoácidos essenciais, baixo teor de gordura e importantes para a manutenção do músculo e outros tecidos. Pesquisas vêm demonstrando que o sorvete pode ser um veículo adequado para microrganismos probióticos e para algumas substâncias prebióticas, como inulina e oligofrutose. Aliado a este aspecto, a ampla aceitação dos sorvetes e o crescimento do consumo, estimulam a continuidade de estudos visando ao desenvolvimento de sorvetes funcionais. O objetivo deste estudo foi desenvolver um sorvete funcional à base de isolado protéico de soro (IPS) fermentado com *Kefir*, avaliar a viabilidade de BAL e de bactérias com potencial probiótico no sorvete fermentado nas condições de processamento e armazenamento de 90 dias, caracterizar a composição físico-química e analisar sensorialmente o produto. Foram desenvolvidas três formulações de sorvete contendo diferentes fibras dietéticas, sendo utilizadas inulina (SWI) um prebiótico, polidextrose (SWP) e maltodextrina (SWM) com função de substituição de gordura. A quarta formulação foi a amostra padrão (SP). O teor de proteínas do SWI, SWP e SWM variou de 11,16 a 11,80 % (m/v) e foi verificada diferença significativa entre o SWI em relação a SWP e SWM, enquanto que o SP, apresentou teor de 3,72 %. Os sorvetes desenvolvidos apresentaram alto teor protéico confirmando o que era esperado neste estudo. O teor de lipídeos não apresentou diferença significativa entre as amostras SWI, SWP e SWM, variando de 0,439 a 0,448 % (m/v), e o SP apresentou teor de 7,450 %, isso mostra que os ingredientes alimentares utilizados possuem papel como substitutos de gordura, podendo-se considerar os produtos como sorvetes diet, visto que o teor de gordura foi inferior a 0,5 % (m/v). Os ingredientes alimentares estudados contribuíram para a redução da gordura e conseqüente redução calórica em relação ao SP. A análise microbiológica foi conduzida através de contagens de microrganismos com potencial probiótico e BAL viáveis e os resultados atingiram valores mínimos de 10⁸ UFC/ g nas três formulações de sorvete (SWI, SWP e SWM), sendo realizadas quinzenalmente durante o período de 90 dias, e permaneceram constantes mostrando a resistência dos microrganismos aos processos tecnológicos para obtenção do sorvete. As fibras podem ter desempenhado atividade protetora para os potenciais probióticos, mantendo os índices finais de sobrevivência, enquanto que a amostra SP sem fibras apresentou diminuição dos valores após 60 dias. Foi realizado sequenciamento e identificação de isolados das quatro amostras e houve a ocorrência em todas as formulações da espécie *Lactobacillus kefir*, exceto no SP que tem sido relatada por alguns autores

como promotora de efeitos benéficos incluindo a adesão ao muco gastrointestinal, atividade antimicrobiana e inibição de adesão patogênicos, modulação da resposta imune, resistência à bile e prevenção de aparecimento de diabetes do tipo 1, entre outros. A intenção inicial foi contar *Lactococcus lactis* em M17 mais nistatina, mas esse meio com a matriz *Kefir* não apresentou seletividade assim como agar MRS maltose e MRS clindamicina. Quanto aos atributos sensoriais, o sorvete com prebiótico inulina apresentou aceitação semelhante ao sorvete padrão, seguido do SWP, em SWM a aceitação foi menor em relação às outras 3 formulações. As três formulações apresentaram teor reduzido de gordura, alto teor proteico, foram adicionadas de fibras e apresentaram contagens altas de microrganismos vivos e com potencial probiótico. As propriedades funcionais do soro protéico, da inulina, da polidextrose e da maltodextrina melhoraram as características nutricionais, substituindo parcial ou totalmente outros ingredientes, como gordura, açúcares, resultando em um produto funcional, teor reduzido de gordura (diet), baixo teor de açúcares e baixas calorias.

Palavras-chave: Sobremesa láctea. IPS Grãos de *Kefir.*, Baixo teor de gordura. *L. kefiri.*

SAITO, Paulo Terumitsu. **Functional ice cream preparation using fermented protein isolate-based serum by Kefir**. 2016. 130 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Several health benefits and consumer awareness in relation to probiotics and functional ingredients such as whey protein has attracted interest in the development and marketing of products such as *Kefir*, with functional interest. Among the benefits attributed to *Kefir*, studies have reported that lactic acid bacteria (LAB) present in *Kefir* grains produce bacteriocins and *Kefiran* polysaccharide substances and that have been held accountable for its antimicrobial properties. The whey protein can moreover be used as fat substitute having digestible proteins, rich in essential amino acids, low fat content that are important to maintain muscle and other tissues. surveys/assays have shown that ice cream can be a suitable carrier for probiotic microorganisms and prebiotic like inulin and oligofructose. Allied to this, the widespread acceptance of sorbets and worldwide consumption growth, stimulate the continuity of studies aimed at developing functional ice cream. The aim of this study was to develop a functional ice cream adding protein isolate fermented serum based *Kefir*, to determine LAB and potential probiotic viability in fermented cream during processing and storage conditions, to characterize the physical and chemical composition and sensorial performance. Three ice cream formulations containing different dietary fibers have been developed and are used: inulin (SWI) a prebiotic; polydextrose (SWP) and maltodextrin (SWM) with fat replacement function. The fourth formulation was a standard sample (SP). The protein content of SWI, SWP and SWM samples ranged from 11.16 to 11.80% (w/v) and there was significant difference between SWI to SWP and SWM, whereas the SP presented a lower content of 3.72%. Developed ice cream showed high protein content confirming what was expected in this study. The lipid content was not significantly different between the SWI, SWP and SWM samples, ranging from 0.439 to 0.448% (w/v), and the SP showed 7.450 % content, it shows that the food ingredients used have function as a substitute for fat, may be considered like diet ice cream, whereas the fat content was less than 0.5% (w/v). Food ingredients studied contributed to the reduction of fat and resulting in caloric reduction compared to SP. Microbiological testing was conducted by microbial counts with probiotic potential and total LAB counts that reached the minimum values of 10^8 CFU / g in the three ice cream formulations (SWI, SWP and SWM) being performed for 90 days and remained constant showing the resistance of microorganisms to technological processes for obtaining ice cream. The fibers may have played protective action on potential probiotic, keeping the final survival rate, whereas the sample SP without fibers showed decreased values after 60 days. After Sequencing and identification was performed of isolates of the four of the four samples isolates the occurrence in all the formulations of *Lactobacillus kefir* has occurred, except in the SP, that has been reported by some authors as a promoter of beneficial effects including adherence to gastrointestinal mucus, antimicrobial activity and inhibition pathogenic adhesion, modulation of immune response, resistance to bile and preventing type 1 diabetes in, among others. The original intention was to count *Lactococcus lactis* in M17 plus Nystatin but this medium used with *Kefir* matrix proved not to be selective as well as MRS maltose agar and clindamycin MRS agar.

As for the sensory attributes, ice cream with prebiotic inulin showed similar acceptance to the standard ice cream, followed by the SWP, in SWM acceptance was lower compared to the other 3 products. The three formulations showed reduced fat, high protein content and fibers and maintained high counts of live microorganisms with a probiotic potential. The functional properties of whey protein, inulin, polydextrose and maltodextrin improved nutritional characteristics, and replacing part of all other ingredients such as fat and sugars, resulting in a functional low fat, low-sugar and low-calorie product.

Keywords: Dairy dessert. Whey protein isolate. *Kefir* grains. Low fat. *L. kefir*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Transformações do glóbulo de gordura durante processamento e estrutura tridimensional de sorvete	21
Figura 2 - Grãos de <i>Kefir</i>	40
Figura 3 - Microscopia eletrônica do grão de <i>Kefir</i> , apresentando associação simbiótica entre as bactérias e leveduras	44
Figura 4 - Microscopia eletrônica dos grãos de <i>Kefir</i> mostrando bactérias e leveduras em carboidrato ou proteína	46
Figura 5 - Obtenção e estrutura de inulina e oligofrutose	50
Figura 6 - Estrutura Molecular da Polidextrose	52
Figura 7 - Fluxograma da produção de sorvete funcional a base de soro protéico fermentado com <i>Kefir</i>	57
Figura 8 - Gel representativo de PCR para gênero <i>Lactobacillus</i> sp (247 pb)	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Crescimento no consumo de sorvetes no Brasil nos últimos 12 anos.....	29
Gráfico 2 - Crescimento no consumo de sorvetes per capita por ano no Brasil nos últimos 12 anos.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Consumo mundial de sorvete.....	28
Tabela 2 - Microrganismos probióticos regulamentados pela ANVISA antes de 2016	36
Tabela 3 - Concentrações de microrganismos nos grãos de <i>Kefir</i> , cultura mãe e bebida.....	45
Tabela 4 - Proporção dos ingredientes utilizados na produção dos sorvetes.....	56
Tabela 5 - Composição físico-química dos ingredientes majoritários.....	68
Tabela 6 - Composição físico-química das amostras de sorvete padrão e sorvetes funcionais.....	69
Tabela 7 - Acidez, pH e Lactose do Sorvete Padrão e Sorvetes Funcionais	72
Tabela 8 - Valor energético médio das 4 formulações de sorvete.....	76
Tabela 9 - Contagem de bactérias ácido-lácticas nas diferentes formulações de sorvetes funcionais ao longo de 90 dias de estocagem a -18°C.....	78
Tabela 10 - Contagem em MRS-maltose e MRS-clindamicina nas diferentes formulações de sorvetes funcionais ao longo de 90 dias de estocagem a -18°C.....	86
Tabela 11 - Média das notas atribuídas aos sorvetes pelos provadores.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIS	Associação Brasileira de Indústria de Sorvetes
IPS	Isolado Protéico de Soro
FAO	Food and Agriculture Organization
WHO	World Health Organization
BAL	Bactérias ácido-lácticas

1 INTRODUÇÃO

A função fundamental da dieta alimentar é fornecer nutrientes suficientes para atender exigências metabólicas do organismo, proporcionando ao consumidor uma sensação de satisfação e bem-estar. Evidências, entretanto, suportam a teoria de que, além das necessidades nutricionais, a dieta pode modular atividades biológicas e desempenhar papéis prejudiciais ou benéficos ao organismo (MENRAD, 2003).

Atualmente, os consumidores estão mais preocupados com as conseqüências que hábitos alimentares e o modo de vida podem acarretar para sua saúde e bem-estar (DELIZA et al, 2005). Assim, há uma procura por uma alimentação saudável, com um alto teor de nutrientes essenciais para o organismo (SANTOS, 2001) e exigindo do setor industrial cada vez mais o desenvolvimento de novos produtos. Conseqüentemente, os consumidores estão aproveitando mais dos recursos alimentares disponíveis, para manter um equilíbrio nutritivo no organismo (PEREIRA, 2003).

O interesse no desenvolvimento e aperfeiçoamento da produção de produtos alimentícios tem aumentado nos últimos anos devido à conscientização dos consumidores sobre os diversos benefícios à saúde promovidos por produtos funcionais e probióticos, como o *Kefir*, e algumas substâncias prebióticas (LOURENS-HATTINGH, 2002; MENRAD, 2003; CRUZ et al., 2009). De outro lado, proteínas de soro possuem características funcionais e igualmente benéficas, podendo ser usadas como substitutas de gordura, pela facilidade de digestão, presença de aminoácidos essenciais e baixo teor de gordura (HARAGUCHI, 2006).

Dentre os benefícios de interesse microbiológico atribuídos ao *Kefir*, está a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARROTE, 2000). Estudos relatam que as bactérias ácido-lácticas dos grãos do *Kefir* produzem bacteriocinas e exopolissacarídeos como o *Kefiran* que possuem propriedades antimicrobianas contra bactérias (RODRIGUES et al., 2005).

Pesquisas vêm demonstrando que o sorvete pode ser um veículo adequado para microrganismos probióticos e para algumas substâncias prebióticas, como inulina e oligofrutose (CRUZ et al., 2009). Aliado a este aspecto, a ampla aceitação dos sorvetes, tanto por parte do público infantil, infante-juvenil e adulto quanto do público da terceira idade, e o crescimento do consumo interno, estimulam

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	SORVETES.....	20
3.1.1	Lipídeos	21
3.1.2	Sólidos Não Gordurosos do Leite (SNGL)	22
3.1.3	Edulcorantes.....	23
3.1.4	Substitutos de gordura, estabilizantes e emulsificantes	23
3.1.4.1	Maltodextrina	25
3.1.5	Água e ar	25
3.2	SORVETES PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS	26
3.3	PROTEÍNAS.....	30
3.3.1	Proteínas do Soro.....	31
3.3.1.1	Classificação e produtos do soro.....	32
3.4	PROBIÓTICOS	34
3.5	<i>KEFIR</i>	39
3.5.1	Definição.....	39
3.5.2	Aspectos Gerais	39
3.5.3	Grãos de <i>Kefir</i>	40
3.5.4	Características dos Grãos de <i>Kefir</i>	42
3.5.5	Composição - Características Microbiológicas	43
3.5.6	Atividade Antimicrobiano	46
3.6	LACTOCOCCUS LACTIS.....	48
3.7	PREBIÓTICOS.....	48
3.7.1	Inulina	50
3.7.2	Polidextrose	52
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	54

4.1	MATERIAIS.....	54
4.2	PREPARO DO KEFIR	54
4.3	ELABORAÇÃO DA FORMULAÇÃO DO SORVETE.....	54
4.3.1	Processamento do Sorvete	56
4.4	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	58
4.4.1	Amostras	58
4.4.2	<i>Salmonella</i>	58
4.4.3	<i>S.aureus</i>	59
4.4.4	<i>Coliformes totais, Coliformes a 45 °C e E.coli</i>	59
4.4.5	<i>Lactococcus lactis</i>	60
4.4.6	Bactérias ácido-láticas	60
4.4.7	Meio seletivo diferencial MRS-maltose e MRS-clindamicina	61
4.5	REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE (PCR)	61
4.5.1	Linhagens Bacterianas	61
4.5.2	Extração de DNA dos isolados bacterianos.....	62
4.5.3	Identificação molecular de <i>Lactobacillus</i>	62
4.5.4	Eletroforese em gel de agarose.....	63
4.5.5	Identificação da espécie por Sequenciamento	63
4.6	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	64
4.6.1	Análise Físico-Química para Ingredientes e Sorvetes	64
4.6.2	"Overrun"	65
4.6.3	pH.....	65
4.6.4	Acidez em Ácido Láctico.....	65
4.7	ANÁLISE SENSORIAL	66
4.7.1	Teste Afetivo de Aceitação	66
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	68
5.1.1	Índices de Ácido Láctico, pH e Lactose	71
5.2	INCORPORAÇÃO DE AR (OVER RUN)	75
5.3	CALORIAS.....	75
5.4	ALEGAÇÃO PARA PROPRIEDADES FUNCIONAIS	76
5.5	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA: PATOGÊNICOS	77

5.6	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA: CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS	77
5.7	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>LACTOBACILLUS</i>	81
5.8	CONTAGEM NO MEIO SELETIVO DIFERENCIAL MRS-MALTOSE	85
5.9	ANÁLISE SENSORIAL	88
6.	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE	109
	APÊNDICE A – Padrão Microbiológico para Sorvetes	109
	APÊNDICE B – Alinhamento das sequências obtidas pelo sequenciamento do gene rRNA 16S com as sequências depositadas GenBank, utilizando o algoritmo BLASTn	110
	APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO NA FORMA DE CONVITE PARA SORVETE PROBIÓTICO A BASE DE SORO PROTÉICO FERMENTADO COM <i>KEFIR</i> NA ANÁLISE DE ACEITAÇÃO	121
	APÊNDICE D – FICHA DE RECRUTAMENTO DE PROVADORES OU JULGADORES PARA TESTE DE ACEITAÇÃO E TERMO DE CONSENTIMENTO.....	122
	APÊNDICE E – FICHA TESTE DE ACEITAÇÃO	123
	ANEXOS	124
	ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO PROJETO DE DISSERTAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA	124
	ANEXO 2 – INFORMAÇÕES TÉCNICAS DA INULINA Frutafit IQ, SENSUS	125
	ANEXO 3 – INFORMAÇÕES TÉCNICAS DA POLIDEXTROSE, TATE & LYLE.....	126
	ANEXO 4 – INFORMAÇÕES TÉCNICAS DA MALTODEXTRINA - Maltogill® 20	127
	ANEXO 5 – INFORMAÇÕES TÉCNICAS DA ERITRITOL, Zerose erythritol, Cargill	128

ANEXO 6 – INFORMAÇÕES TÉCNICAS DO MALTITOL, SHANDONG	129
ANEXO 7 – NFORMAÇÕES TÉCNICAS DO ISOLADO PROTÉICO DE	
SORO, Alibra CL 3987	130

a continuidade de estudos visando ao desenvolvimento de sorvetes funcionais (ABIS, 2012; CRUZ et al., 2011).

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios é cada vez mais desafiador na atualidade, onde há a exigência de contemplar a expectativa do consumidor, ofertando um alimento simultaneamente atrativo e saudável (SHAH, 2007; GRANATO et al., 2010).

O sorvete pertence ao grupo dos gelados comestíveis que, por definição, são os produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, ou de uma mistura de água e açúcares, que podem ser adicionados de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto (BRASIL, 2005).

Segundo a ABIS (2010), o Brasil ocupa a décima posição no ranking mundial de consumo de gelados comestíveis, mas o consumo destes produtos vem crescendo ao longo dos anos. Crescente também é o interesse por alimentos enriquecidos com agentes bioativos, sendo uma das prioridades de pesquisa em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Neste segmento, os produtos lácteos probióticos detêm a maior popularidade, representando cerca de 65 % do mercado mundial de alimentos funcionais (AGRAWAL, 2005).

O objetivo deste estudo foi desenvolver um sorvete funcional à base de isolado protéico de soro, fermentado com cultura de *Kefir*, e caracterizar as formulações através de análises físico-químicas e microbiológicas além de avaliar a aceitação do produto por parte dos consumidores.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi desenvolver um sorvete funcional à base de isolado protéico de soro, fermentado com cultura de *Kefir*, bem como avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e aceitação sensorial por parte dos consumidores.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um sorvete funcional com três formulações diferentes com baixo teor de gordura a base de isolado protéico de soro: uma formulação preparada com inulina, a segunda formulada com polidextrose, a terceira com maltodextrina. Desenvolver e comparar com uma formulação de sorvete padrão;
- Realizar análises físico-químicas de “overrun”, pH, acidez e composição centesimal nos ingredientes e nas formulações;
- Realizar análises microbiológicas de contagem de bactérias ácido-lácticas e microrganismos probióticos potenciais;
- Verificar a viabilidade destas bactérias presentes nos sorvetes durante período de 90 dias de armazenamento;
- Identificar nas formulações desenvolvidas e fermentadas com *Kefir* a presença de *Lactococcus lactis subsp. lactis* ou outros probióticos para alegação de um sorvete com potencial probiótico, por métodos convencionais e moleculares através da reação em cadeia de polimerase (PCR) e sequenciamento;
- Verificar se há diferença na aceitação do produto por parte dos consumidores em relação às diferentes formulações contendo isolado protéico e adição de inulina; polidextrose ou maltodextrina e sorvete padrão;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SORVETES

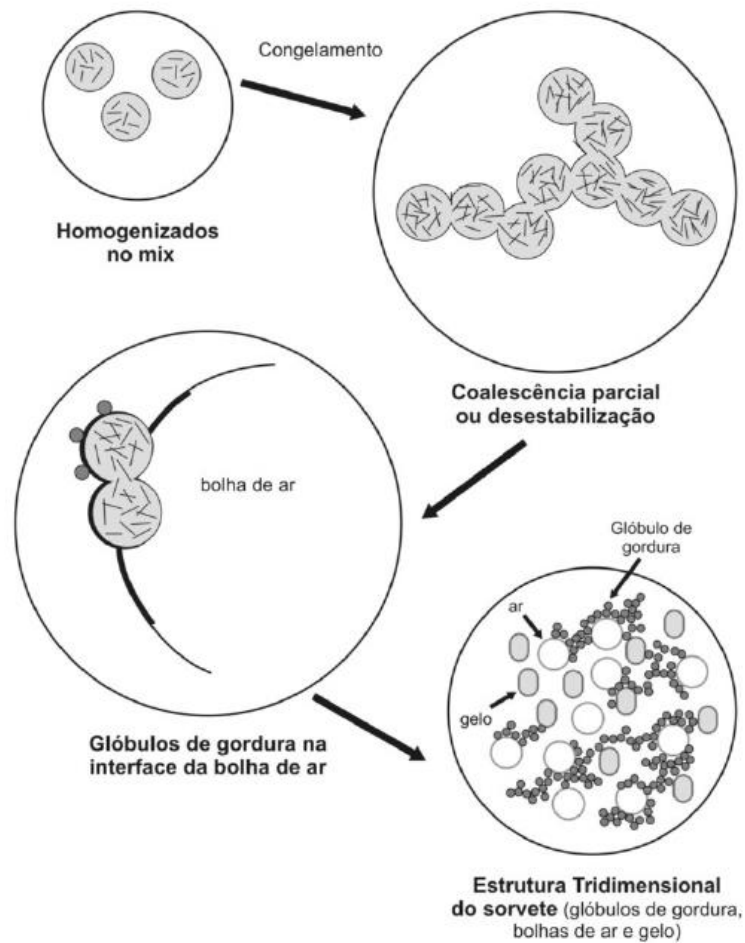
A definição para o sorvete é variável de acordo com a legislação de cada país (PAPADEMAS; BINTSIS, 2002). Segundo a ANVISA, os sorvetes pertencem ao grupo dos gelados comestíveis, onde são definidos como produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, sob contínua agitação, pasteurizada, composta de ingredientes lácteos ou não, com ou sem a adição de outros ingredientes ou substâncias como: açúcares, corantes, aromatizantes, estabilizantes e emulsificantes, que podem ser adicionados desde que não descaracterizem o produto, visando atender aos padrões definidos para sólidos totais e "overrun" (incorporação de ar) em condições que garantam a conservação do produto, no estado congelado, ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumidor (BRASIL, 2005).

Sorvete está inserido na chamada "família de sobremesas congeladas" e está definido na Portaria nº379 (Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Gelados Comestíveis, Preparados, Pós para o Preparo e Bases para Gelados Comestíveis) do Diário Oficial da União de 29 de abril de 1999.

Bioquimicamente e por características tecnológicas, os sorvetes são considerados sistemas alimentícios coloidais estruturalmente complexos, que são espumas compostas por bolhas de ar envoltas por uma emulsão parcialmente congelada (GOFF, 2008).

Inicialmente, os ingredientes para fabricação de sorvetes eram leite, creme, açúcar e estabilizantes. Atualmente são utilizados uma grande gama de ingredientes: água, gordura, emulsificantes, sólidos não gordurosos do leite, açúcares, adoçantes, estabilizantes, emulsificantes, ar e gelo são os principais componentes desse produto. Os cristais de gelo e os glóbulos de gordura sólida estão dispersos em uma fase contínua líquida não congelada, que contém proteínas, carboidratos, sais e gomas, denominada fase soro (Figura 1) (WALSTRA et al., 1999; SOLER; VEIGA, 2001; GOFF, 2008).

Figura 1 – Transformações do glóbulo de gordura durante processamento e estrutura tridimensional de sorvete



Fonte: CRUZ et al. (2011)

3.1.1 Lipídeos

A gordura é o ingrediente de maior importância em sorvetes, podendo apresentar teores de 0 a 24%, dependendo de fatores como padrões legais e qualidade do produto final, embora o teor de gordura nos sorvetes comerciais geralmente está em torno de 10 a 12% (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996; SOLER; VEIGA, 2001). Este ingrediente interage com os demais desenvolvendo o sabor e a estrutura característica do produto (COELHO; ROCHA, 2005). A melhor fonte de gordura láctea é o creme de leite fresco, porém há outras fontes mais utilizadas no Brasil, como creme de leite congelado, manteiga, gordura láctea anidra, gordura

láctea fracionada e misturas de leite concentrado (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996; SOLER; VEIGA, 2001).

Os glóbulos de gordura concentram-se na superfície da célula de ar durante o congelamento do sorvete. Aumentando o teor de gordura, diminui o tamanho dos cristais de gelo, devido à interrupção do espaço onde eles se formariam (SOLER; VEIGA, 2001). Porém, os lipídeos são componentes altamente calóricos (9 kcal/g), e uma vez que o excesso de calorias acarreta em obesidade, esta é frequentemente citada como um grave problema de saúde para a população (RONDA et al, 2005).

3.1.2 Sólidos Não Gordurosos do Leite (SNGL)

Os sólidos não gordurosos do leite (SNGL) são os sólidos do leite desnatado, que consistem em média de 55% de lactose, 37% de proteína, 8% minerais. Estes sólidos possuem alto valor nutricional, e por não conferirem aroma e sabor intensos, apresentam características de melhorar a palatabilidade do sorvete (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996; SOLER; VEIGA, 2001). A quantidade adequada de SNGL, tem efeitos importantes como: conferir corpo e textura necessário ao sorvete, prevenir o sabor rançoso e realçar certos sabores, além de conferir resistência à mastigação (SOLER; VEIGA, 2001).

As propriedades funcionais dos SNGL são praticamente exclusivas das proteínas do leite, que durante a homogeneização, cobrem a superfície dos glóbulos de gordura, evitando uma possível separação durante a incorporação de ar e o congelamento, aumentando o seu rendimento. Tais proteínas também depositam-se na superfície das bolhas de ar, estabilizando-as, e ainda podem absorver parte da água livre, evitando os cristais de gelo (AMIOT et al., 1991; SOLER; VEIGA, 2001).

O excesso de lactose, porém, leva à uma diminuição do ponto de congelamento e sua cristalização pode causar alterações na textura do produto, como a adstringência no sorvete, sendo considerado como defeito tecnológico do produto. (SOLER; VEIGA, 2001).

3.1.3 Edulcorantes

O açúcar é um dos principais componentes do sorvete, onde a sua função é aumentar a aceitação do produto, tornando-o doce, deixando mais agradável e delicado o sabor e o aroma do sorvete. Também possui a função de aumentar a viscosidade e teor de sólidos na mistura (mix), o que melhora o corpo e textura do sorvete (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996; SOLER; VEIGA, 2001).

Por muito tempo a sacarose foi o único componente usado para adoçar os sorvetes, o que conseqüentemente tornou-a um padrão para comparação do efeito de doçura dos demais adoçantes (SOLER; VEIGA, 2001). Apesar do gosto doce ter um alto índice de aceitação por parte dos consumidores, por motivos de saúde, a população busca alternativas de substituição da sacarose com substâncias de menor teor calórico (PORTMANN; KILCAST, 1996). Neste contexto são utilizados edulcorantes que são substâncias alternativas ao açúcar simples, que conferem gosto doce ao sorvete, e são utilizados parcial ou totalmente na substituição da sacarose (PINHEIRO et al., 2005). Geralmente os edulcorantes utilizados são: sacarina, ciclamato, aspartame, sucralose e os polióis.

3.1.4 Substitutos de gordura, estabilizantes e emulsificantes

O sorvete tem uma estrutura extremamente complexa, sendo aerada, parcialmente congelada e com uma emulsão onde as bolhas de ar são cercadas por glóbulos de gordura. Portanto, a gordura não apenas confere uma sensação de cremosidade, mas também atua na formação da estrutura do sorvete. Conseqüentemente, a substituição de gordura em produtos alimentícios é multifuncional, pois sua localização na matriz do alimento influencia as propriedades químicas, físicas e sensoriais (FLACK, 1996).

Os estabilizantes são utilizados para prevenir a formação de grandes cristais de gelo, que ocorrem com a flutuação da temperatura durante a estocagem do sorvete, e também para prevenir a separação do soro de leite tanto no congelamento e no descongelamento (SOLER; VEIGA, 2001). Possuem alta capacidade retenção de água, o que resulta em uma textura macia e proporciona

corpo ao produto final, proporcionam resistência ao derretimento e uniformidade ao produto (SOLER; VEIGA, 2001).

A estrutura molecular de emulsificantes possui regiões hidrofóbicas e hidrofílicas que auxiliam substâncias incompatíveis (água e gordura) do mix a combinarem-se de forma a produzir um produto de estrutura uniforme e macia, onde ocorre redução da tensão interfacial, estabilizando o mix, assim facilitando a formação de emulsão e espuma (SOLER; VEIGA, 2001).

Há um grande número de estabilizantes à base de carboidratos sendo considerados como substitutos de gordura, incluindo celulose, gomas, dextrinas, fibras, maltodextrinas, amidos e povidexose. Estes ingredientes alimentares adicionados aos alimentos, proporcionam corpo e espessamento, produzindo assim uma percepção sensorial similar à da gordura (MATTESS, 1998) . Estes ingredientes têm sido utilizados há vários anos em muitos alimentos substituindo a gordura parcial ou totalmente. Os carboidratos que são absorvidos, como amidos modificados e dextrinas, fornecem 4 kcal/g, enquanto aqueles que não são absorvidos pelo organismo contêm poucas calorias (PINHEIRO; PENNA, 2004).

Diferentes tipos de substitutos de gordura (“fat replacers”) estão disponíveis no mercado e sua classificação está baseada, principalmente, na natureza química e na origem do produto, onde, de acordo com sua composição, dividem-se em três categorias: 1) produtos à base de proteínas; 2) produtos à base de carboidratos; 3) produtos à base de óleos e gorduras. Cada uma destas categorias tem um efeito diferenciado nos alimentos. Suas propriedades funcionais adequam-se diversamente nos diferentes produtos alimentícios, assim como seus atributos sensoriais. Assim, para algumas aplicações é melhor realizar combinação de dois ou mais substituintes de gordura para se obter uma característica sensorial e funcional desejada (LUCCA; TEPPER, 1994; SIVIERI; OLIVEIRA, 2003).

Segundo Mattes (1998), como substitutos de gordura para gelados comestíveis podem ser utilizados a povidexose; amidos modificados; dextrinas e maltodextrinas; goma guar; carragena; xantana; CMC; celulose microcristalina e proteínas do soro de leite.

3.1.4.1 Maltodextrina

A maltodextrina é o resultado da hidrólise parcial do amido ou da fécula e consiste de uma mistura de sacarídeos com uma ampla distribuição da massa molecular entre polissacarídeos e oligossacarídeos, onde normalmente apresenta-se comercialmente na forma de pó branco, composto por uma mistura de vários oligômeros da glicose, compostos por 5 a 10 unidades (CHRONAKIS, 1998).

Nos últimos 30 anos, vêm sendo utilizadas como aditivos alimentares, sendo carboidratos que fornecem 4 kcal/g de energia. Quando possuem baixa DE (aproximadamente 5) apresentam características sensoriais semelhantes à gordura, podendo ser utilizadas como substitutos de gorduras. Além desta propriedade funcional, as maltodextrinas também são utilizadas como agentes geleificantes e espessantes, para prevenir a cristalização, auxiliar na dispersibilidade, controlar o congelamento (CHRONAKIS, 1998). Em geral, as maltodextrinas são solúveis em água, possuem baixa densidade, possuem baixo poder adoçante e não possuem sabor de amido. Devido a estas propriedades são muito utilizadas nas indústrias de alimentos.

A maltodextrina é recomendada para utilização na fabricação de sorvetes com baixo teor de gordura, pois sua aplicação confere uma sensação de cremosidade na boca, diferente de outros substituintes que tem contribuído para uma maior dureza (ROLLER, 1996).

3.1.5 Água e ar

A água é fase contínua do sorvete, estando presente como líquido, sólido e como uma mistura de dois estados físicos, e o ar está disperso e incorporado na emulsão de gordura em soro. A interface entre a água e o ar é estabilizada por fina camada de material não-congelável e por glóbulos de gordura ou substituintes batidos, onde essa interface está associada ao agente emulsificante (SOLER; VEIGA, 2001).

O "overrun" é o aumento do volume pela incorporação de ar, uma das etapas mais importantes na produção de sorvetes, uma vez que influencia

diretamente a qualidade e rendimento, e deve ser mantido nos padrões de legislação (SOLER; VEIGA, 2001).

3.2 SORVETES PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS

Os sorvetes não devem ser considerados somente como uma simples guloseima ou produto de verão, mas como uma sobremesa valiosa e nutritiva, que contribui com elementos muito importantes para uma alimentação equilibrada (CASTILHO, 1992). Estudos demonstram que o sorvete pode ser um veículo adequado para microrganismos probióticos, devido à sua composição, pois inclui proteínas, gorduras, lactose, açúcares e outros compostos, que podem servir como substrato para que os microrganismos possam fermentar ou apenas veicular probióticos. Além disso, o pH do sorvete, próximo à neutralidade, permite a possibilidade de sobrevivência de microrganismos probióticos durante o armazenamento (CHRISTIANSEN et al., 1996; CRUZ et al. 2009).

No entanto, é essencial garantir que o produto desenvolvido ofereça uma quantidade adequada de microrganismos probióticos viáveis, resistentes ao congelamento e armazenamento do sorvete (FOSCHINO et al. 1992). Buriti et al. (2010) e Alamprese et al. (2002) demonstraram que baixas temperaturas, 4 °C a -28 °C podem garantir uma maior taxa de sobrevivência microbiana. Entretanto, é imprescindível considerar que as operações de congelamento e descongelamento possam reduzir a viabilidade de microrganismos probióticos, devido a danos às estruturas celulares, decorrentes da formação de cristais de gelo, e redução ou interrupção da atividade metabólica (ROBINSON, 1985). Nesse sentido, estabilizantes e substitutos de gordura são utilizados para evitar a formação de grandes cristais de gelo e prevenir tais danos.

Diversos estudos apontam que as substâncias prebióticas, inulina e oligofrutose têm sido adicionadas a sorvetes (SCHALLER-POVOLNY; SMITH, 1999; CAUSEY et al., 2000; EL-NAGAR et al., 2002). Devereux et al. (2003) defendem o emprego de inulina como substituto parcial da gordura em sorvetes, em função de seu desempenho como agente de textura. O interesse do consumidor por produtos com um teor reduzido de gordura, incentiva o emprego dessas substâncias nestes produtos, que deste modo, podem contribuir para a diminuição da incidência de

doenças crônico-degenerativas (AKALIN et al., 2007). As substâncias prebióticas também apresentam um leve gosto doce, permitindo a menor adição de açúcares em sorvetes e conseqüentemente, garantindo uma redução do conteúdo em calorias (KAUR; GUPTA, 2002).

Estudos recentes demonstram a inexistência de influências negativas nos atributos sensoriais de produtos adicionados de agentes probióticos e prebióticos. A análise sensorial fornece um conhecimento prévio sobre a aceitação destes produtos pelo possível mercado consumidor, bem como, pode determinar características específicas e descrever um perfil sensorial, atuando como base para o desenvolvimento de um produto inovador (GRANATO et al., 2010).

A inclusão de ar "overrun", essencial para a obtenção das características tecnológicas esperadas para o sorvete, também pode afetar a viabilidade de alguns microrganismos probióticos, visto que o excesso de oxigênio é tóxico para a maioria destes, que são microaerófilos ou anaeróbios facultativos (KAILASAPATHY; SUITANA, 2003).

Além do valor nutricional, o sorvete apresenta alta digestibilidade, quando bem homogeneizado. Esses fatores associados a outras características como sabor doce e textura macia fazem dele um alimento ideal para todas as idades. Pela fácil assimilação, o sorvete é excelente para idosos, pessoas de apetite difícil e em casos de úlcera e gastrites crônicas. Exerce função terapêutica, pois, pelo resfriamento, ocorre descongestionamento da mucosa gástrica inflamada e estimula a secreção de enzimas digestivas. Portanto, o sorvete reúne vários atributos em um só produto, resultando na junção da nutrição e o prazer do consumo (CASTILHO, 1992).

Entretanto, apesar dos benefícios que possam ser atribuídos ao consumo de sorvete, um sorvete ideal deverá obedecer aos limites de confiança quanto aos atributos de qualidade do produto: sabor, corpo, textura, características de derretimento, cor, embalagem, conteúdo microbiológico e composição (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996). A avaliação sensorial por parte dos consumidores em relação a aceitação do produto é crítica para o desenvolvimento de novos produtos. O sorvete oferece uma combinação de propriedades sensoriais altamente desejáveis, sendo estes classificados em categorias de aparência (cor, maciez, regularidade), aroma, sabor, textura ou preenchimento bucal (dureza, viscosidade, cremosidade) (GUINARD, 1998).

Outra contradição, mesmo com os benefícios que possam ser atribuídos, seria o hábito de ingestão, mas o Brasil apresenta baixos índices de consumo de sorvete, cerca de 2,7 litros por pessoa/ano, conforme pode ser verificado na Tabela 1. O setor de laticínios em geral, ciente dessa situação, tem buscado o desenvolvimento de tecnologias que permitam inovações nos produtos, além de explorar as expectativas do mercado e as necessidades dos consumidores.

Tabela 1 – Consumo mundial de sorvete

Países	Consumo (Litros)	Classificação
Nova Zelândia	26,30	1
Estados Unidos	22,50	2
Canadá	17,80	3
Austrália	17,80	4
Suíça	14,40	5
Suécia	14,20	6
Finlândia	13,90	7
Dinamarca	9,20	8
Itália	8,20	9
França	5,40	10
BRASIL	4,74	11
Alemanha	3,80	12
China	1,80	13

Fonte: ABIS (2010)

Segundo dados da empresa de pesquisa A/C Nielsen, o consumo de sorvetes cresceu 17,4% em 2007 em relação a 2006 (ABIS, 2008), e apresenta cerca 76,49% de crescimento em consumo de sorvete do ano de 2003 a 2012 (ABIS 2012). Este crescimento está relacionado à variedade de produtos no mercado, como por exemplo, a opção de sorvete com incorporação de agentes probióticos que tem como público alvo principalmente aqueles indivíduos que se preocupam com a relação entre saúde e dieta.

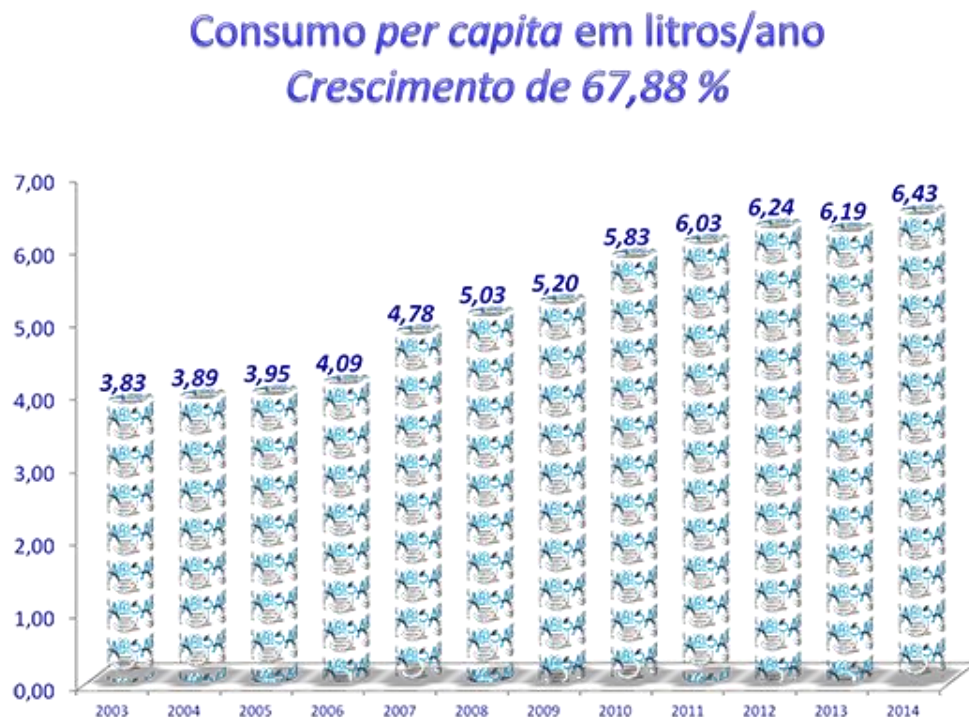
Conforme os Gráficos 1 e 2 a seguir, estão disponibilizados dados mais atuais que apontam o crescente consumo de sorvetes Brasil.

Gráfico 1 - Crescimento no consumo de sorvetes no Brasil nos últimos 12 anos



Fonte: ABIS (2014)

Gráfico 2 - Crescimento no consumo de sorvetes per capita por ano no Brasil nos últimos 12 anos



Fonte: ABIS (2014)

3.3 PROTEÍNAS

As propriedades funcionais de proteínas são definidas como as propriedades físico-químicas que afetam o seu comportamento no alimento durante o preparo, processamento e armazenamento, e contribuem para a qualidade e atributos sensoriais dos alimentos (RIBEIRO; SERAVALLI 2007).

As propriedades funcionais cada vez mais são importantes na seleção de proteínas para uso como ingrediente em alimentos. Isso significa que um único teste funcional não avalia o desempenho final do ingrediente protéico. O desempenho depende, portanto, de funções múltiplas, sendo determinado também pela presença de outros ingredientes não-protéicos presentes no sistema, onde a composição e seqüência de aminoácidos, carga líquida e sua distribuição, relação hidrofobicidade/hidrofilicidade, estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas, flexibilidade/rigidez, e a habilidade de reagir com outros componentes, influenciam a funcionalidade de proteínas em alimentos (ANTUNES, 2003; ARAÚJO 2001). Outro problema associado à avaliação da funcionalidade protéica refere-se à falta de metodologia padronizada, o que, evidentemente, dificulta a comparação de resultados obtidos por diferentes pesquisadores. (ANTUNES, 2003).

As proteínas são componentes de todas as células e respondem pela grande maioria de suas funções. Funcionam como enzimas; estão envolvidas no controle da motilidade, inclusive a contração muscular; tem papel imunológico; participam do armazenamento e do transporte de nutrientes (mioglobina, hemoglobina e ferritina) e de outras substâncias e na integração do funcionamento de diversos órgãos, por meio dos hormônios. (ANTUNES, 2003)

A capacidade das proteínas realizarem múltiplas funções está relacionada com a diversidade estrutural que apresentam. Portanto, há funcionalidade que se modifica de maneira desejável, quando algum tipo de processamento é empregado, como o aquecimento em alguns produtos, onde as propriedades emulsificantes se manifestam juntamente com as propriedades de gelatinização (devido ao aquecimento) durante a fabricação do produto (ANTUNES, 2003).

3.3.1 Proteínas do Soro

O soro de leite é um subproduto resultante da fabricação de queijos, obtido por coagulação da caseína por adição de ácido ou de enzima (soro doce). Possui alto valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais, destacando-se o conteúdo em sulfurados (WIT, 1998; NEVES, 2001). Assim, as proteínas de soro do leite, também conhecidas como *whey protein*, são extraídas a partir do fluído (soro de leite) obtido da separação do coágulo durante o processo de fabricação do queijo e coalhadas (YOUNG, 1980; NAUM 2010). Durante décadas, o soro protéico do leite era descartado pela indústria de alimentos. Somente a partir da década de 70 os cientistas passaram a estudar as propriedades dessa proteína. Atualmente ela tem sido utilizada por ser rica fonte de aminoácidos essenciais requeridos diariamente pelo organismo (NAUM, 2010).

A composição das proteínas do soro obtidas varia segundo diversos fatores: fonte do leite, método de preparação, tipo de queijo produzido e especificações individuais dos equipamentos para a produção do queijo. Desses fatores é difícil destacar o de maior importância, mas, sem dúvida, a qualidade inicial do leite e os procedimentos para a produção de queijo e caseína são primordiais. Entretanto, todos eles, em determinadas circunstâncias, influem de forma significativa nas características funcionais dos diversos produtos de soro (ANTUNES, 2003).

As proteínas do soro apresentam propriedades nutricionais excelentes devido ao seu conteúdo em aminoácidos sulfurados, em lisina e em triptofano. Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro do leite quando não desnaturadas são muito conhecidas pela versatilidade de suas propriedades funcionais tecnológicas como ingredientes em produtos alimentícios, principalmente por sua elevada solubilidade, boa capacidade de formação de espumas e emulsões, além da capacidade de gelificação a 85°C (KINSELLA, 1984; WIT; KLARENBECK, 1984).

Proteínas do soro do leite não desnaturadas, em si, possuem baixa massa molecular, fácil digestão, alta absorção intestinal, alto valor biológico por conter aminoácidos essenciais para formação da síntese protéica, sendo consideradas um alimento funcional (NAUM, 2010). São ricas em lisina, leucina, treonina e cistina, e devido aos componentes biológicos (lactoferrina, β -

lactoglobulina, α -lactoalbumina (ALA), glicomacropéptídeos (GMP) e imunoglobulinas) (HARAGUCHI, 2006), também proporcionam melhoria no sistema imunológico, evitando riscos de infecção e inflamação. Grande número de informações tem sido acumulado sobre as principais proteínas do soro: β -lactoglobulina, alfa-lactoalbumina, albumina do soro bovino (BSA) e imunoglobulinas (Ig). Outras proteínas, embora em menores proporções, também estão presentes, lactoferrina, lisozima e peptídeos derivados da caseína (ANTUNES, 2003).

A leucina é um importante desencadeador de síntese protéica dando ganho de massa muscular e altas concentrações desse aminoácido favorecem a manutenção da massa muscular durante a perda de peso (NAUM, 2010). Pennings et al (2011), foram capazes de medir a absorção e metabolismo das diferentes fontes de proteínas, onde o aminoácido leucina apresentou a maior taxa de absorção inicial de aminoácidos do soro do leite em relação a caseína, e os pesquisadores acreditam que isso possa estar relacionado com a maior disponibilidade de leucina no soro de leite. O foco na disponibilidade da leucina é consistente com observações de que o aminoácido leucina é um importante regulador pós-prandial da síntese de proteínas musculares.

A α -lactoalbumina é caracterizada por ser uma proteína de PM = 14,2 kDa, sendo de fácil absorção, e também apresenta atividade antimicrobiana contra *E.coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (LÖNNERDAL, 2003).

3.3.1.1 Classificação e produtos do soro

O soro protéico pode ser classificado com base na sua composição, mas geralmente são agrupados de acordo com o seu conteúdo de proteína. Na indústria e na alimentação, o soro pode ser utilizado na forma líquida, concentrada, ou em pó (HUFFMAN, 1996).

Soro líquido pasteurizado fresco: é raramente utilizado nas indústrias de alimentos, devido ao elevado custo de transporte e deterioração durante o armazenamento, além da dificuldade de aceitação sensorial do produto que possui alto teor de sais minerais (MILLER, 2000). O soro é utilizado na sua forma bruta principalmente como alimento para animais. Dentre as alternativas para

o uso do soro líquido podem ser citadas a fabricação de ricota e a fabricação de bebidas lácteas (WONG et al., 1999).

Soro em Pó: Obtido pela remoção de 95 % da umidade (desidratação), onde os constituintes são mantidos nas proporções relativas ao soro in natura (HUFFMAN, 1996; MILLER, 2000). Algumas limitações nas propriedades do soro seco para uso direto em alimentos, principalmente as altas concentrações de sais e lactose, conduziram ao seu fracionamento (WONG et al., 1999).

Soro em Pó Deslactosado: Quando o conteúdo de lactose original do soro é reduzido obtém-se o soro em pó com teor reduzido de lactose (AIRES, 2010).

Soro desmineralizado: Para reduzir o teor de minerais no soro, utiliza-se membranas de troca iônica por eletrodialise, ou outras técnicas de separação por membranas. A eletrodialise é um processo que combina o uso de membranas de troca iônica com gradiente de potencial elétrico, objetivando a remoção de espécies iônicas de soluções aquosas. Ela é capaz de remover íons com cargas elétricas positivas ou negativas (MIZUBUTI et al., 1994).

Concentrado protéico de soro (CPS): é o produto líquido obtido pela remoção parcial da água do soro, mantendo todos os outros constituintes nas mesmas proporções encontradas no soro original. Denomina-se CPS quando um produto de soro tem 25 % a 89 % de proteínas em base seca e geralmente são agrupados de acordo com esse teor. Os CPS mais comuns possuem um teor de proteína de 35, 50, 65 e 80 % em base seca (YADA, 2004; MATTHEWS, 1984)

Isolado protéico de soro de leite (IPS) é a forma comercial mais pura das proteínas do soro e contém entre 90 e 95 % de proteína. Contém gordura e lactose em quantidades muito baixas, sendo muitas vezes isentas desses dois componentes. Combinando-se duas operações, microfiltração, para remover a gordura, e hidrólise de lactose, para remover a lactose, é possível produzir um isolado contendo mais de 90 % de proteína. Esses pré-tratamentos são seguidos por ultrafiltração e diafiltração. Outra forma de produzir o isolado envolve a utilização de troca iônica como pré-tratamento, antes do processo de ultrafiltração. O isolado protéico possui excelentes propriedades de geleificação, aeração, emulsificação, retenção de água e gordura. As principais aplicações de isolado protéico incluem produtos lácteos, de panificação e de confeitaria, snacks, salgadinhos, aperitivos e carnes processadas (RICHARDS, 2002).

Embora os produtos protéicos do soro possam ser usados apenas em razão de seus valores nutricionais, suas aplicações como ingredientes funcionais são cada vez mais importantes para a indústria. Nos últimos anos tem sido enorme o esforço dos pesquisadores em encontrar novas aplicações para os produtos de soro, e para isso é fundamental que entendamos os mecanismos através dos quais as diversas propriedades funcionais se manifestam (ANTUNES, 2003).

3.4 PROBIÓTICO

O crescente interesse dos consumidores, e conseqüentemente da indústria alimentícia, com a saúde, faz crescer a necessidade de entendimento da relação entre saúde e alimentação, que por sua vez, tem despertado interesse da comunidade científica, que tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de alguns alimentos na redução de riscos de certas doenças, além do considerável interesse em incentivar as pesquisas de novos componentes naturais e o desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado para estes ingredientes. Entre esses produtos, probióticos e prebióticos tem sido um segmento de grande importância em função de comprovações científicas sobre o papel destes na promoção de saúde (THAMER; PENNA, 2006; ARAÚJO, 2007; CRUZ et al., 2009).

Já é conhecida a importância da microbiota do trato gastrointestinal (TGI) na saúde humana. Dentre suas funções podemos destacar a inibição da colonização por patógenos, a fermentação de substratos produzindo metabólitos importantes para manutenção da saúde da mucosa intestinal e a modulação do sistema imune (DOUGLAS; SANDERS, 2008; LOMER et al., 2008).

Pesquisas mostram, entre os alimentos funcionais, que o uso de probióticos e prebióticos, pode modular a microbiota do TGI levando a vários benefícios. São vistos como promotores de saúde e que podem estar associados à redução do risco de doenças crônicas degenerativas e não transmissíveis, ao tratamento de infecções intestinais e alergias além de potencial efeito anticarcinogênico. A associação dos probióticos com os prebióticos dá origem a um

produto simbiótico que pode aumentar as chances de crescimento e colonização das bactérias probióticas no organismo humano (GIBSON; GLENN 2004; SAAD, 2006;).

Os probióticos são microrganismos que quando ministrados em determinadas doses alcançam o intestino e são capazes de exercer efeitos positivos na saúde do hospedeiro. A definição mais utilizada é de Fuller (1989): probióticos são suplementos alimentares microbianos vivos, que afetam benéficamente o hospedeiro, melhorando o balanço microbiano intestinal. A Food and Agriculture Organization (FAO) das Nações Unidas e World Health Organization (WHO) definem probióticos como microrganismos vivos (bactérias e leveduras), que quando ingeridos ou localmente aplicados em número suficiente, conferem um ou mais benefícios à saúde do hospedeiro (FAO / WHO, 2001).

Segundo Ferreira (2009), a ingestão de probióticos confere inúmeros benefícios à saúde, dentre estes, cabe destacar as modulações: da constipação intestinal; de diarreias de diferentes origens; da intolerância à lactose; do sistema imune; de episódios alérgicos; do colesterol; de doenças inflamatórias intestinais; de encefalopatia portal sistêmica; de infecções urogenitais e da síndrome de fadiga crônica. Outros benefícios seriam o equilíbrio da microbiota intestinal; controle de patógenos intestinais; controle de *Helicobacter pylori*; atividade antitumorigênica, anti-cancerígena e atividade anti-hipertensiva;

Os microrganismos probióticos previamente regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para aplicação em alimentos com alegação de propriedade funcional, são mencionados na Tabela 2 porém esta lista deixou de existir em março do corrente (BRASIL, 2016). Nos demais países, órgãos reguladores como FAO e WHO caracterizam como probióticos um número mais amplo de microrganismos (SAXELIN, et al., 2005; SHAH, 2007; SOCCOL, et al., 2010).

Tabela 2 - Microrganismos probióticos regulamentados pela ANVISA antes de 2016**Probióticos***Lactobacillus acidophilus**Lactobacillus casei var. shirota**Lactobacillus casei var. rhamnosus**Lactobacillus casei var. defensis**Lactobacillus paracasei**Lactococcus lactis**Bifidobacterium bifidum**Bifidobacterium animalis* (incluindo a subsp. *B. lactis*)*Bifidobacterium longum**Enterococcus faecium***Fonte:** ANVISA (2008)

Segundo a ANVISA, a quantidade mínima viável de microrganismos probióticos deveria estar situada entre 8 e 9 log UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008) porém em março deste ano esta exigência também caiu e a Gerência Geral de Alimentos (GGALI) da Anvisa atualizou a lista das alegações de propriedade funcional ou de saúde e os requisitos específicos para utilização dos textos padronizados (BRASIL, 2016). Quantidades mínimas entre 6 e 7 log UFC g⁻¹ do microrganismo probiótico no produto pronto para consumo são recomendadas por normas internacionais (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1992; SHAH, 2010).

As exigências que um microrganismo probiótico deve atender são: resistência ao ambiente ácido estomacal, à bile e às enzimas pancreáticas; adesão às células da mucosa intestinal; capacidade de colonização; produção de substâncias antimicrobianas contra bactérias patogênicas e ausência de translocação. Entre os probióticos, dois grandes grupos microbianos foram particularmente estudados em termos experimentais e clínicos, e são comercializados: as bactérias ácido-lácticas (BAL) e as leveduras (PENNA, 2000). As bactérias ácido-lácticas e bifidobactérias tem sido vastamente utilizadas como probióticos em alimentos funcionais. Compreendem certas espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, capazes de interagir com a microbiota intestinal por meio de antagonismo contra grupos específicos de

microrganismos pela produção de agentes antimicrobianos, competição por sítios de adesão na superfície do epitélio intestinal, competição por nutrientes e modificação dos processos metabólicos intestinais (FERREIRA, 2009). O efeito dos probióticos sobre o estado de saúde do hospedeiro é dependente de mudanças que eles possam promover na composição e na atividade metabólica da microbiota residente (BUDDINGTON, 2009).

O uso de culturas de bactérias probióticas estimula o crescimento de microrganismos preferenciais, promove a competição com inúmeras bactérias potencialmente prejudiciais e reforça os mecanismos de defesa naturais do corpo (PUUPPONEN-PIMIÄ et al, 2002; GISMONDO, DRAGO; LOMBARDI, 1999; AUDY et al., 2012). O mecanismo do efeito anti-patogênico pode ser através de diminuição do pH intestinal pela produção de ácidos graxos de cadeia curta como ácido acético, ácido láctico ou ácido propiônico; tornando indisponíveis nutrientes vitais aos patógenos; alterando o potencial redox do meio ambiente; produzindo peróxido de hidrogênio; produzindo bacteriocinas ou outras substâncias inibidoras (KAILASAPATHY; CHIN, 2000).

As bactérias ácido-lácticas são os mais importantes microrganismos probióticos normalmente associados com o trato gastrointestinal humano. Estas bactérias são organismos Gram-positivos, em forma de bastão, não formadoras de esporos, catalase-negativas, que são desprovidas de citocromos e são de hábito não aeróbio porém aero-tolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativas, sendo o ácido láctico principal produto final da fermentação de açúcar (AXELSSON, 1993). Bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são mais frequentemente empregadas como suplemento probiótico. Alguns desses microrganismos utilizados como probióticos são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* etc.

Outros microrganismos comumente empregados como probióticos pertencem ao gênero *Bifidobacterium*, que também são Gram-positivas e em forma de haste, mas são estritamente anaeróbias. Estas bactérias podem crescer em pH na faixa de 4,5 a 8,5. Bifidobactérias ativas fermentam hidratos de carbono, produzindo principalmente ácido acético e ácido láctico, em uma relação molar de 3:2 (v/v). As espécies mais reconhecidas de Bifidobactérias usadas como probióticos

são *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium longum*. Além destas bactérias, *Bacillus cereus var. toyoi*, *Escherichia coli strain Nissle*, *Propionibacterium freudenreichii*, e alguns tipos de leveduras, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*, também foram identificados como tendo efeitos probióticos (ANAL, 2007).

Em função dos benefícios à saúde, bactérias probióticas são incluídas cada vez mais em produtos lácteos fermentados, como iogurtes, queijos semiduros e duros, sorvetes e sobremesas congeladas a partir de produtos lácteos fermentados (ANAL, 2007).

A capacidade de sobrevivência e multiplicação de microrganismos probióticos tem influência nos benefícios produzidos por este grupo. As bactérias devem ser metabolicamente estáveis e ativas no produto, sobreviver à passagem através do trato digestivo superior em grandes números e ter efeitos benéficos quando os microrganismos chegarem no intestino do hospedeiro (GILLILAND, 1989). O padrão para qualquer alimento adicionado de probióticos com alegações de saúde posto à venda é que ele deve conter por grama pelo menos 10^8 a 10^9 UFC de bactérias probióticas viáveis (BRASIL, 2005). Segundo consenso de peritos internacionais Hill et al. (2014), recomendam seguir as normas da Ministero della Salute (2013), que a quantidade mínima suficiente para a colonização intestinal por uma cepa de fermento láctico é de pelo menos 10^9 de células vivas por cepa por dia. No entanto, ainda existem vários problemas no que diz respeito à baixa viabilidade de bactérias probióticas em alimentos lácteos. Vários fatores têm sido relatados que afetam a viabilidade de probióticos em produtos lácteos fermentados e incluem pH, conteúdo de peróxido de hidrogênio, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura de armazenamento, espécies e linhagens de organismos presentes, concentração de ácidos láctico e acético ou mesmo concentração de proteína de soro de leite. Sobrevivência é, evidentemente, essencial para que os organismos possam colonizar o intestino humano, e é um dos temas mais importantes para os benefícios de saúde associados às bactérias probióticas (ANAL, 2007).

Diferentes abordagens que aumentam a resistência e viabilidade desses microrganismos sensíveis contra condições adversas têm sido propostas, incluindo a apropriada seleção de linhagens resistentes a ácido e sais biliares, uso de recipientes ou embalagens impermeáveis ao oxigênio, fermentação em duas

etapas, adaptação a diferentes tipos de stress, incorporação de micronutrientes como peptídeos ou aminoácidos, microencapsulação e manipulação genética (GISMONDO; DRAGO; LOMBARDI et al., 1999; ROSS; DESMOND; STANTON; 2005; PINEIRO; STANTON, 2007).

3.5 KEFIR

3.5.1 Definição

O grão de *Kefir* é uma estrutura complexa formada por bactérias ácido-láticas, acéticas e leveduras em uma associação simbiótica envolvidas por uma matriz de polissacarídeo (OTLES; CAGINDI, 2003; FAMWORTH, 2005; SARKAR, 2008).

A legislação brasileira vigente (BRASIL, 2007) e *Food and Agriculture Organization / World Health Organization* (FAO / WHO, 2011), define *Kefir* como o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, cuja fermentação se realiza com cultivos ácido lácticos elaborados com grãos de *Kefir*, espécies de *Lactobacillus kefiri*, *Lactococcus ssp*, *Leuconostoc ssp*, e *Acetobacter ssp* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono, sendo seus grãos constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnispurus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp.* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*".

3.5.2 Aspectos Gerais

Kefir significa "sentir-se bem" em turco e é inserida na categoria de bebida fermentada com uma mistura de ácido láctico e etanol. É também conhecido por Kefyr, Kephir, Kefer, Kiaphur, Knapon, Kepi e Kippi (SARKAR, 2008).

Kefir é um leite fermentado "carbonatado", refrescante, com leve sabor ácido, possui consistência cremosa, uniforme e espessa, feito de grãos de

Kefir, com dupla fermentação, alcoólica e ácida resultando na produção de pequenas quantidades de dióxido de carbono, álcool e moléculas aromáticas que conferem à bebida características sensoriais singulares. Muitas combinações aromáticas contribuem para o sabor e odor agradáveis e característicos (HERTZLER et al., 2003; IRIGOYEN et al., 2005; SARKAR, 2008; FARNWORTH e MAINVILLE, 2008).

3.5.3 Grãos de *Kefir*

Os grãos de *Kefir* possuem formas irregulares, massa gelatinosa, cujo tamanho pode variar de 1 a 6 mm de diâmetro, tendo coloração variando de branco a amarelo, lembrando pequenas couve-flores ou pipoca (OTLES e CAGINDI, 2003). Contém bactérias ácido-lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), bactérias ácido-acéticas (*Acetobacter*) e leveduras, misturadas com caseína e açúcares complexos presos a uma matriz de polissacarídeos, descrita como uma associação simbiótica (Figura 2).

Figura 2 - Grãos de *Kefir*



Fonte: FARNWORTH (2005)

Segundo Libudzisz e Piatkiewicz (1990), apesar da intensa pesquisa e muitas tentativas realizadas para produzir grãos de *Kefir* a partir de culturas puras ou mistas, normalmente presentes nos grãos, nenhum resultado positivo foi relatado. Este resultado provavelmente pode ser atribuído ao fato de que muito pouco se sabe sobre o mecanismo de formação dos grãos. É muito provável que uma combinação de diferentes fatores tenha influência no aumento da biomassa dos grãos de *Kefir*, incluindo a renovação de leite em intervalos regulares, a temperatura de cultivo, lavagem dos grãos e a presença de nutrientes essenciais na concentração correta no meio de crescimento (CHEN et al., 2009).

A produção do grão de *Kefir* é baseada no cultivo contínuo em leite, que resulta no aumento da biomassa de 5 a 7 % (m/v) por dia (LIBUDZISZ; PIATKIEWICZ, 1990). Porém, os grãos de *Kefir* podem somente crescer a partir de grãos preexistentes (SHOEVERS; BRITZ, 2003).

Diferentes autores relatam dificuldades encontradas para um melhor rendimento na produção dos grãos de *Kefir*, onde apontam falta de padronização na proporção grão/leite usada na produção de *Kefir*. Vários autores empregaram 20-50g/L, enquanto outros utilizaram 20-100g/L e 50-100g/L. Rea e colaboradores (1996) usaram 1g/L como iniciadora, já Marshall e Cole (1985) usaram 200g de grãos de *Kefir* para fermentar um 1L de leite.

Garrote e colaboradores (1998) sugeriram a concentração de 10g/L de grãos de *Kefir* em relação ao substrato, adequada para produzir um produto viscoso e não muito ácido, sendo a concentração de 100g/L recomendada para uma bebida ácida, com baixa viscosidade e mais efervescente. Mas, segundo SARKAR (2008), a proporção 5 % provou ser adequada para produção de etanol e ácidos voláteis.

É recomendado também, que os grãos de *Kefir* em operações comerciais, sejam mantidos viáveis por propagações diárias e devem ser substituídos caso a capacidade para fermentar o leite torne-se prejudicada (KOROLEVA, 1982; FARNWORTH, 2005). Segundo Witthuhm et al. (2005), não é recomendada a secagem do grão ao ar para aplicação comercial devido ao desenvolvimento de coloração e sabores indesejáveis. O armazenamento sob baixas temperaturas parece ser o melhor caminho para manter as propriedades dos grãos de *Kefir* por longo período. Garrote et al. (1998) mostraram que os grãos de *Kefir* armazenados a -80 °C ou -20 °C por 120 dias não alteraram as características

de fermentação quando comparado aos grãos frescos. Entretanto grãos acondicionados a 4 °C não obtiveram qualidade aceitáveis após serem refrigerados.

3.5.4 Características dos Grãos de *Kefir*

A composição microbiana dos grãos de *Kefir* é variável, sofrendo influência da região geográfica de origem, do tempo de utilização, do substrato utilizado para proliferação dos grãos e das técnicas utilizadas para sua manipulação (WSZOLEK et al., 2001; WITTHUHN, 2004; ZANIRATI, 2012), e conseqüentemente, produtos com diferentes composições serão formados (OTLES; CAGINDI, 2003). A composição físico-química do *Kefir* pode variar conforme a idade dos grãos, as matérias-primas utilizadas, a microbiota e a tecnologia empregada no processamento (GARCIA et al., 1984). Normalmente, a porcentagem de ácido láctico varia de 0,8 a 1,1 (% m/m) e a de álcool de 0,5 a 1,0 (% m/v). Na Áustria, por exemplo, tem-se a preferência por um produto com baixos teores de gás carbônico, álcool e ácidos (GARCIA et al., 1984).

A composição do *Kefir* depende diretamente do tipo de leite usado e durante a fermentação ocorrem mudanças na composição dos nutrientes e de outros ingredientes do leite. Os principais produtos da fermentação da lactose do leite pelos grãos de *Kefir* são o ácido láctico, ácido acético, acetaldeído, diacetil, etanol e dióxido de carbono (CO₂). O *Kefir* é um produto rico em vitamina B₁, B₁₂, cálcio, aminoácidos e vitaminas K. O ácido láctico, encontrado em concentrações elevadas após a fermentação, é derivado de aproximadamente 25 % da lactose original presente no leite. Os aminoácidos valina, leucina, lisina e serina, são formados durante a fermentação; a quantidade de alanina e de ácido aspártico aumenta em relação ao seu valor inicial. A produção de dióxido de carbono, produzido por leveduras, contribui para o acentuado gosto ácido sendo considerado típico da bebida *Kefir*. Em alguns casos há o aparecimento de ácido fólico e de biotina, sintetizados durante a fermentação do *Kefir* e às vezes os teores de tiamina e riboflavina aparecem diminuídos (OTLES; CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2005). Por conseguinte, as características químicas do leite, o processo tecnológico de produção do *Kefir* e os microrganismos presentes na cultura são fatores que

influenciam as características físico-químicas e sensoriais durante o período de estocagem da bebida (OTLES e CAGINDI, 2003).

A lactose é consumida e transformada pela cultura microbiana o que torna o leite assimilável por indivíduos que possuem moderada intolerância a lactose (FARNWORTH e MAINVILLE, 2008).

3.5.5 Composição - Características Microbiológicas

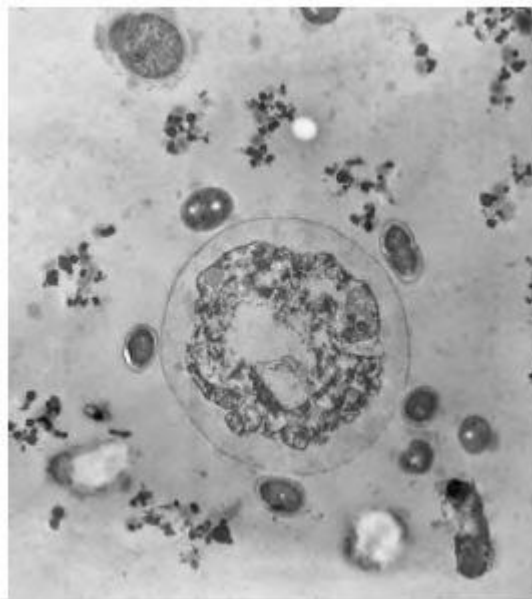
Garrote, Abraham e Antoni (1997) usaram microscópio eletrônico de varredura para investigar a localização dos microrganismos nos grãos de *Kefir*. Sugeriram que a população de leveduras e bactérias ácido-lácticas (*Lactobacillus* e *Lactococcus spp*) não estão perfeitamente distribuídas nos grãos. Segundo Otles e Cagindi (2003), a organização dos microrganismos no grão não é completamente conhecida. A matriz do grão é composta por um complexo de 13% de proteína (massa seca), 24% de polissacarídeo, detritos celulares e componentes desconhecidos. O principal polissacarídeo é uma substância hidrossolúvel denominada *Kefirano*.

Os lactobacilos e lactococos localizam-se na parte periférica do grão, enquanto que, as leveduras no interior. Farnworth e Mainville (2008) relatam outros estudos de microscopia eletrônica dos grãos que afirmam que a composição da superfície dos grãos é diferente do interior, devido às diferenças de pH existente nos grãos. O interior dos grãos possui menor pH inibindo o crescimento de espécies de *Lactobacillus* e *Lactococcus* e favorece o crescimento de leveduras, predominando as bactérias na superfície e as leveduras no interior dos grãos. Estudos relatam que os microrganismos presentes na superfície dos grãos causam grande impacto no processo de fermentação (FARNWORTH e MAINVILLE, 2008; SARKAR, 2007).

Diversos estudos relatam as dificuldades de isolar e identificar os microrganismos presentes nos grãos e na bebida de *Kefir*, pois ocorre uma associação entre as várias espécies de bactérias e leveduras. Segundo Koroleva (1991), estudando e monitorando os grãos de *Kefir*, notou-se a dificuldade em isolar esses microrganismos, pois quando isolados em culturas puras, eles não se desenvolvem em leite ou tem diminuição da sua bioatividade. Portanto, os grãos de

Kefir são um exemplo de simbiose (Figura 3), onde o crescimento e sobrevivência de uma espécie é dependente da outra. Segundo Farnworth e Mainville (2008), o crescimento de diversas bactérias ácido-lácticas isoladas dos grãos de *Kefir* pode ser estimulado na presença de leveduras, indicando que as leveduras presentes nos grãos de *Kefir* são essenciais para a integridade e viabilidade da microbiota dos grãos de *Kefir*.

Figura 3 - Microscopia eletrônica do grão de *Kefir*, apresentando associação simbiótica entre as bactérias e leveduras



Fonte: FARNWORTH e MAINVILLE (2008)

Koroleva (1991) afirmou que bactérias e leveduras do *Kefir*, quando isoladas e separadas, não crescem em leite ou tinham sua atividade bioquímica reduzida, dificultando o estudo da população microbiana dos grãos de *Kefir*.

Em geral, bactérias ácido-lácticas (BAL) são mais numerosas (10^8 - 10^9 UFC/g) que leveduras (10^5 - 10^6 UFC/g) e bactérias ácido-acéticas (BAA) (10^5 - 10^6 UFC/g) nos grãos de *Kefir*. Entretanto, as condições de fermentação podem afetar este padrão (KOROLEVA, 1991; GARROTE et al., 2001; FARNWORTH, 2005).

É reconhecido que as leveduras têm um importante papel na fabricação de leites fermentados, pois fornecem nutrientes essenciais de crescimento tais como aminoácidos e vitaminas, alteram o pH, liberam etanol e produzem CO_2 (VILJOEN, 2001). Porém, são menos estudadas que as bactérias,

apesar de fornecerem ambiente para o crescimento das bactérias e produzirem metabólitos que contribuem com o sabor do *Kefir* (CLEMENTI et al., 1989; KWAK et al., 1996; SIMOVA et al., 2002; FARNWORTH, 2005).

Segundo Irigoyen e colaboradores (2005), as concentrações dos microrganismos variam consideravelmente nos grãos de *Kefir*, cultura mãe e bebida (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentrações de microrganismos nos grãos de *Kefir*, cultura mãe e bebida

Bactérias ácido lácticas	Grãos (ufc/g)	Cultura mãe (ufc/g)	Bebida (ufc/g)
<i>Lactococcus spp</i>	10 ⁶	10 ⁸ -10 ⁹	10 ⁹
<i>Leuconostoc spp</i>	10 ⁶	10 ⁷ -10 ⁸	10 ⁷ -10 ⁸
Lactobacilos termofílicos	10 ⁸	10 ⁵	10 ¹ -10 ⁸
Lactobacilos mesofílicos	10 ⁶ -10 ⁹	10 ² -10 ³	-
Bactérias ácido acéticas	10 ⁸	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁴ -10 ⁵
Leveduras	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁴ -10 ⁵

Fonte: Irigoyen et al. (2005)

Os grãos de *Kefir* contêm microbiota em simbiose (Figura 4), com misturas de leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Torula kefir*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*S. onisporus*, *S. cerevisiae* e *S. exiguus*), misturas de bactérias ácido-lácticas (*Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp* e *Oenococcus spp.* e *Streptococcus spp.*), *Bifidobacterium spp.* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus.*) incluindo uma matriz de proteína e polissacarídeo. O produto fermentado deve apresentar as seguintes características: homogeneidade e consistência cremosa; sabor acidulado, picante e ligeiramente alcoólico; acidez menor que 1,0 g de ácido láctico/100g; teor alcoólico entre 0,5 e 1,5 (%v/m); bactérias ácido-lácticas totais no mínimo 10⁷ UFC/g; leveduras específicas no mínimo 10⁴ UFC/g e acondicionamento em frascos com fecho inviolável (AQUARONE, 2001; IRIGOYEN, 2005; PIERMARIA; CANAL; ABRAHAM, 2007; ZANIRATI, 2012).

Figura 4 – Microscopia eletrônica dos grãos de *Kefir* mostrando bactérias e leveduras em carboidrato ou proteína



Fonte: FARNWORTH e MAINVILLE (2008)

Wang e colaboradores (2004) encontraram as seguintes bactérias no *Kefir*: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. As leveduras identificadas foram *Zygosaccharomyces*, *Candida* e *Saccharomyces* spp. (WITTHUHM et al., 2004), *Saccharomyces unisporus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Torulaspota delbrus*, *Torulaspota delbrueckii* e *Debaryomyces hansenii* (LORETAN et al., 2003; SARKAR, 2007).

3.5.6 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do *Kefir* contra vários patógenos pode ser atribuída à produção de metabólitos como os ácidos orgânicos (ácidos láctico e acético), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, diacetil e peptídeos

(bacteriocinas) produzidos pelas bactérias ácido lácticas, durante a fermentação (FARNWORTH, 2005; SARKAR, 2007).

Durante a fermentação, os microrganismos consomem a lactose (diminuição do teor de lactose) (ANFITEATRO, 2012), sintetizam ácido láctico, β -galactosidase que ajuda a hidrolisar a lactose restante depois da bebida ingerida (DE VRESE, 1992), e ação na eliminação de microrganismos patogênicos da microbiota intestinal (OTA, 1999; GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 2000). O *Kefir* já foi testado *in vitro* em laboratório e em animais, onde observou-se propriedades anticancerígenas, antifúngicas, antivirais e antimutagênicas (FARNWORTH, 2005).

Dentre os benefícios de interesse microbiológico atribuídos ao *Kefir*, está a atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 2000). Estudos relatam que as bactérias ácido-lácticas dos grãos de *Kefir* produzem bacteriocinas e o próprio *Kefiran* que são substâncias que tem sido responsabilizada por suas propriedades antimicrobianas (RODRIGUES; CARVALHO; SCHNEEDORF, 2005).

Garrote et al. (2000) ao estudar a atividade inibitória do *Kefir* obtiveram maior inibição dos microrganismos Gram-positivos em relação aos Gram-negativos. Os autores também mostraram que as concentrações de ácido láctico ou ácido láctico mais ácido acético encontradas no sobrenadante do *Kefir* apresentaram atividade inibitória contra *Escherichia coli*. Czamanski et al. (2004) afirmaram que o *Kefir* tem um maior efeito bacteriostático contra bactérias Gram-negativas, mas melhor efeito bactericida contra Gram-positivas.

Santos et al. (2003) demonstraram que *Lactobacillus* isolados dos grãos de *Kefir* apresentaram atividade antimicrobiana contra várias linhagens de *E. coli* (43/58), *Listeria monocytogenes* (28/58), *Salmonella typhimurium* (10/58), *S. enteritidis* (22/58), *Shigella flexneri* (36/58) e *Yersinia enterocolitica* (47/58). Os autores sugeriram que bacteriocinas seriam responsáveis por tal fenômeno, embora elas não tenham sido identificadas.

Salmonella spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, e outros como *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* são os microrganismos de maior importância em saúde pública, contaminando direta ou indiretamente os alimentos, principalmente os produtos de origem animal envolvidos em toxinfecções alimentares (BOARD, 1988).

A utilização do *Kefir* na dieta auxilia na prevenção da contaminação por *E.coli* O-157 enterohemorrágica, pois ele é capaz de aumentar o número de bactérias ácido-lácticas e bífidas, nativas do trato gastrointestinal (OTA, 1999).

3.6 LACTOCOCCUS LACTIS SUBP. LACTIS

Dentre os microrganismos isolados de *Kefir*, há a presença do *Lactococcus lactis* (VINDEROLA; REINHIERMER, 2000; ESPINOSA; NAVARRO, 2010), onde segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2008) era considerado como sendo probiótico.

Estudo que visava verificar as características probióticas de microrganismos encontrados nos grãos de *Kefir* oriundos da Turquia, apresentaram resultados positivos para a produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio, atividade antimicrobiana e produção de diacetil e acetaldeído. Segundo Yüksesdag, Beytali e Aslim (2004), as linhagens de *Lactococcus cremoris* e *Lactococcus lactis* apresentaram propriedades que podem caracterizá-las como probióticas e de possível uso na produção de produtos com alto potencial funcional.

3.7 PREBIÓTICOS

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digestíveis que estimulam seletivamente o crescimento ou atividades de microrganismos benéficos que vivem no intestino para melhorar o equilíbrio microbiano intestinal do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID 1995). Os prebióticos resistem à acidez gástrica no estômago e processos digestivos por enzimas antes de atingirem o cólon e a absorção no intestino grosso (WANG, 2009). Eles são obtidos por extração de fontes naturais (por exemplo, chicória, alho, alho-poró e yacon) usando água ou solvente, ou por processo enzimático e síntese química (reação de trans-glicosilação) a partir de substratos dissacarídicos, como a sacarose ou lactose. Esses componentes atuam mais freqüentemente no intestino grosso, embora possam ter também algum impacto sobre os microrganismos do intestino delgado (SAAD, 2006).

Segundo Gibson et al. (1998), prebiótico é um alimento não digerível, que estimula o crescimento e a atividade da microbiota benéfica ao trato gastro-intestinal. Para ser classificado como prebiótico o composto deve:

- ter resistência a digestão, hidrólise e fermentação no estômago;
- ser seletivamente fermentado por um ou um número limitado de bactérias potencialmente benéficas ao cólon;
- alterar a microbiota do intestino, levando a uma composição microbiana mais saudável.

Os prebióticos modificam a composição da microbiota colônica, de tal forma, que as bactérias com potencial de promoção de saúde tornam-se a maioria predominante (STEFE et al., 2008). Esses compostos desempenham um papel não só facilitando o metabolismo de hospedeiro e a absorção mineral (Ca, Fe e Mg) (SAAD, 2006), mas também estimulando o sistema imunológico, produção de imunoglobulina (IgA), modulação da composição da microbiota intestinal, modulação de citocinas e reforço das defesas do organismo (LOMAX, 2009). Além disso, estudos sugerem que oligossacarídeos além de servirem de substrato para a proliferação de bactérias ácido-lácticas e bifidobactérias, reduzem o crescimento de células de câncer do cólon e patogenicidade de bactérias presentes no cólon através da produção de ácidos graxos de cadeia curta (ROBERFROID, 2002; SAULNIER, 2009). Os mecanismos de ação destes também incluem o reforço da barreira da mucosa intestinal, modificação da microbiota intestinal, prevenção da proliferação de agentes patogênicos e aderência à mucosa intestinal e a transformação da atividade enzimática bacteriana (SAULNIER, 2009).

Adicionalmente, os prebióticos podem inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Eles agem estimulando o crescimento dos grupos endógenos de população microbiana benéfica para a saúde humana, como as bifidobactérias e os lactobacilos, produzindo metabólitos que inibem o crescimento de patógenos (ROBERFROID, 2002). Esses componentes atuam mais freqüentemente no intestino grosso, embora possam ter também algum impacto sobre os microrganismos do intestino delgado (GIBSON e ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, 2001; SAAD, 2006).

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são polímeros de D-frutose terminando com uma molécula de glicose e formam uma classe de prebióticos e a inulina é um exemplo dessa classe (SILVA, 1996).

A alegação para ser considerado prebiótico, pode ser utilizada desde que a recomendação de consumo diário do produto pronto para consumo forneça no mínimo 5 g. A porção deve fornecer no mínimo 2,5 g (BRASIL, 2016).

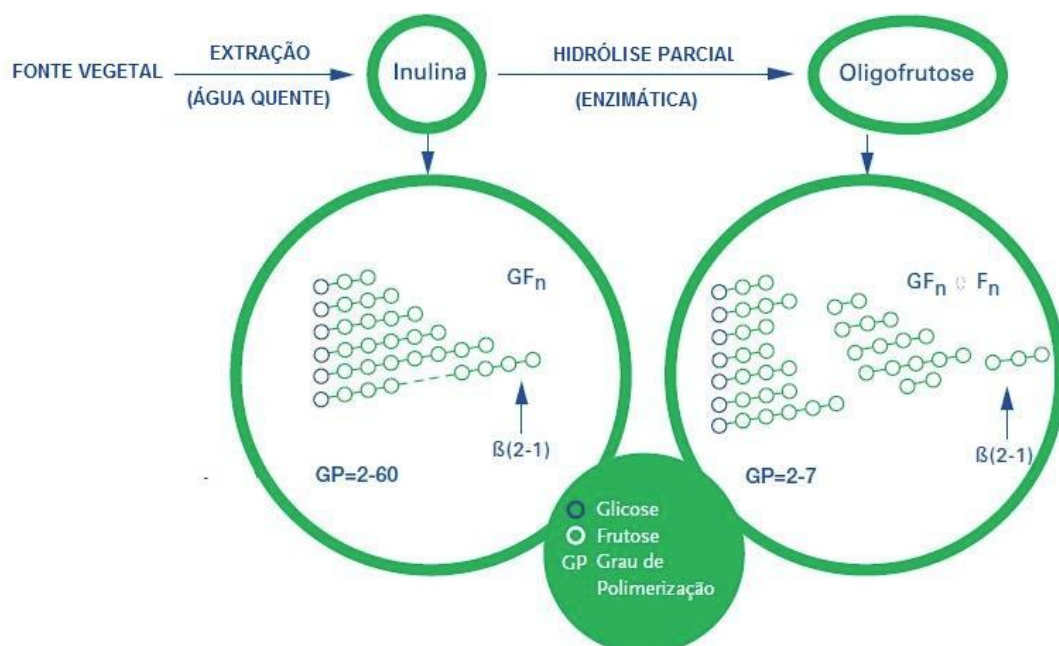
A alegação para considerado fibra alimentar, pode ser utilizada desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 2,5 g de fibras, sem considerar a contribuição dos ingredientes utilizados na sua preparação (BRASIL, 2016).

3.7.1 Inulina

A inulina contém cadeias de duas a 60 unidades de frutose, enquanto os FOS contêm de duas a nove unidades de frutose que são, às vezes, ligadas a uma unidade de glicose terminal. A fermentação de FOS e inulina necessita de enzimas específicas. Bifidobactérias fermentam FOS através da enzima beta-frutosidase e sintetizam as inulinases para a degradação da inulina (GOMIDES, 2006).

A inulina difere da oligofrutose apenas por seu grau de polimerização (Figura 5).

Figura 5 – Obtenção e estrutura de inulina e oligofrutose



Fonte: BENEIO-ORAFI (2013)

A inulina e a oligofrutose são fibras solúveis e fermentáveis, as quais não são digeríveis pela alfa-amilase e por enzimas hidrolíticas, como a sacarase, a maltase e a isomaltase, na parte superior do trato gastrointestinal. Como os componentes da fibra da dieta não são absorvidos pelo organismo, eles penetram no intestino grosso e fornecem substrato para as bactérias intestinais. As fibras solúveis são normalmente fermentadas rapidamente, enquanto que as insolúveis são lentamente ou apenas parcialmente fermentadas (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002). Então, estas substâncias atuam como substrato preferencial e seletivamente metabolizadas pela microbiota benéfica, especialmente por espécies de *Bifidobacterium* e, em menor escala, por espécies de *Lactobacillus*, estimulando seu crescimento, inclusive, suprimindo o crescimento de *Escherichia coli* e de espécies de *Clostridium* no cólon (OLIVEIRA; PENNA, 2008; WANG; GIBSON, 1993).

Como citado acima, a inulina não é digerida pelo estômago e intestino delgado, assim não há contribuição calórica neste processo. No cólon acontece a fermentação da inulina por bactérias, e seus produtos são ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o ácido acético, propiônico e o butírico (ROBERFROID; GIBSON; DELZENNE, 1993; WANG; GIBSON, 1993). Os AGCC produzidos são absorvidos pelo organismo, gerando energia e conseqüentemente, uma contribuição calórica, que pode variar de 1 a 2,2 kcal/g, sendo um valor baixo se comparado à carboidratos digeríveis (ROBERFROID; GIBSON; DELZENNE, 1993; MOLIS et al., 1996).

A extensão da fermentação das fibras solúveis depende da sua estrutura física e química. A fermentação é realizada por bactérias anaeróbias do cólon, levando à produção de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta e gases. Conseqüentemente, há redução do pH do lúmen e estimulação da proliferação de células epiteliais do cólon (CARABIN, FLAMM, 1999).

Quanto às propriedades funcionais tecnológicas, a inulina é menos solúvel que a oligofrutose e tem a habilidade de formar microcristais quando misturada em água ou leite, pois apresentam cadeias mais longas. Estes microcristais são imperceptíveis, mas interagem entre si e forma-se uma textura cremosa que promove uma sensação ao paladar semelhante à da gordura, "enganando" as papilas degustativas. Conseqüentemente, a inulina é comumente usada quando se pretende obter produtos com menor teor de gordura, sendo considerada como substituto da gordura, pois age da mesma maneira em relação à

textura, como fibra alimentar ou agente espessante. (GORDON, 1996; NINESS, 1999; HAULY; MOSCATTO, 2002). É utilizada também como aditivo em produtos lácteos, suplementos alimentares e adoçantes (GORDON, 1996). Segundo NINESS (1999), a inulina tem sido utilizada como substituto da gordura em recheios prontos, sobremesas congeladas e molhos.

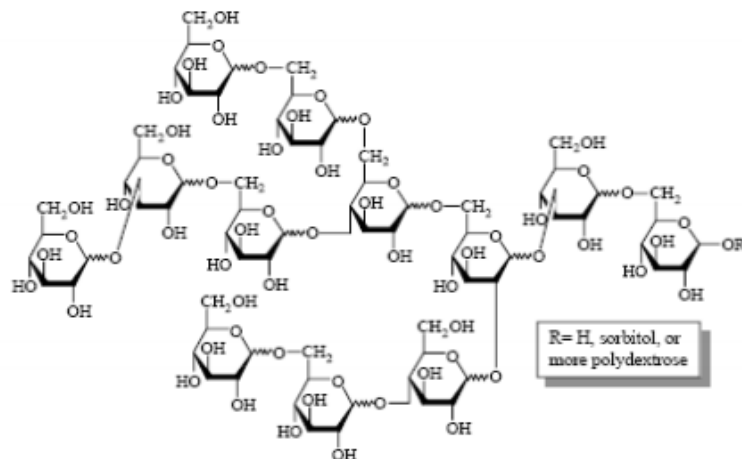
Além disso, o consumo de inulina por pessoas diabéticas é capaz de reduzir os níveis de glicose no sangue (TAPER; ROBERFROID, 1999).

Na década de 90, as autoridades legais em quase todos os países europeus, confirmaram que a inulina poderia ser rotulada como fibra (COUSSEMENT e FRANK, 1998). A ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) realizou pesquisas e *workshops* que fundamentaram sua decisão de considerar oficialmente a oligofrutose e a inulina como fibras alimentares (LEE; PROSKY, 1994).

3.7.2 Polidextrose

A polidextrose é formada por polímeros de glicose, obtida pela policondensação térmica a vácuo da glicose com uma pequena quantidade de sorbitol e ácido cítrico como catalisador, formando cadeias com ligações predominantemente do tipo 1-6, com massa molar variando de 162 a 20.000 (Figura 6) (CRAIG et al., 1998).

Figura 6 - Estrutura Molecular da Polidextrose



Fonte: CRAIG et al. (1998)

Craig et al. (1998) descrevem a polidextrose como polissacarídeos ou oligossacarídeos resistentes reconhecidos como fibras dietéticas, na mesma categoria da inulina e galactoligossacarídeos. Semelhantemente à inulina, a polidextrose apresenta valor energético reduzido de 1 kcal/g, devido a estrutura complexa e compacta da molécula, que impede sua completa digestão enzimática no organismo, e é reconhecida por aprimorar aspectos tecnológicos e nutricionais dos alimentos que as contêm, especialmente aqueles com teor reduzido de gorduras, atuando como substituto de gordura e agente prebiótico (FRANCK, 2002; DEVEREUX et al., 2003). A polidextrose é parcialmente metabolizada, e no máximo 1% da quantidade ingerida passa através da membrana intestinal. Aproximadamente 50% é eliminada com as fezes, 30% é metabolizada em ácidos voláteis e dióxido de carbono, resultando em uma utilização calórica de 1 kcal/g (CÂNDIDO; CAMPOS, 1996).

A polidextrose pode ser usada como um agente de volume, transportador de sabor, redutor do ponto de congelamento, melhorando a textura e a viscosidade, é solúvel e de fácil aplicação, além de ter função umectante. Repõe a quantidade de sólidos do açúcar nos iogurtes, permitindo uma redução calórica de até 75% (ARTZ; HANSEN, 1994).

A polidextrose apresenta viscosidade em solução maior que a da sacarose, proporcionando propriedades de sabor e consistência, e evita a perda de umidade do alimento durante períodos prolongados (PFIZER, 2014). Os limites de uso indicado para bebidas lácteas são de 4 a 10% quando utilizados como substituto do açúcar e de 2 a 5% como substituto de gordura (MITCHELL, 2002).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O material utilizado consistiu de substrato à base de proteína de soro, fermentado com grãos de *Kefir*. Para formulação do sorvete e realização das análises foram necessários isolado protéico de soro, inulina, polidextrose, maltodextrina, mistura de monoacilgliceróis (Emustab), liga neutra (carbometilcelulose, carragena), saborizante de morango, ingredientes estes adquiridos no comércio varejista Baccaro - Esquina Doce de Londrina. O isolado protéico de soro foi obtido através da empresa Alibra de Campinas; inulina e CMC fornecidos pela empresa Metachem; sucralose, polidextrose e maltitol doados pela empresa TOVANI, e edulcorante eritritol doado pela Cargill. A cultura tradicional de *Kefir* foi fornecida pela Prof. Dra. Marly Sayuri Katsuda.

4.2 PREPARO DO KEFIR

Foi utilizada cultura de *Kefir*, e os grãos mantidos imersos em leite integral UHT adquiridos comercialmente à temperatura de 20°C, sendo substituído o leite no período de 1 a 4 dias até a execução do experimento. Quando necessário o congelamento para preservação dos grãos de *Kefir*, para posterior reativação, o inóculo foi preparado descongelando-se os grãos de *Kefir*, retirando todos os resíduos presentes nos grãos com água estéril, filtrando-se através de uma peneira, e armazenando os grãos em leite na proporção 1:3. Foram aplicados períodos mais curtos de transferência, inoculação e eventualmente mais repetitivos quando era necessário ter uma recuperação maior no metabolismo dos grãos de *Kefir*.

4.3 ELABORAÇÃO DA FORMULAÇÃO DO SORVETE

Neste estudo, foram utilizados os seguintes ingredientes para a elaboração da formulação base do sorvete: leite desnatado UHT (69,93%); polióis:

eritritol (5,6%) e maltitol (5,6%), isolado protéico de soro (WPI) (9,79% em peso), celulose microcristalina (0,6%), Emustab (0,7%), liga neutra (0,7%) e de saborizante (2,1%). Teste preliminares no desenvolvimento da formulação foram realizadas através do balanço de massa (SOLER; VEIGA, 2001).

Com a formulação base preparada, foram desenvolvidas três formulações de sorvete contendo diferentes ingredientes alimentares (fibras dietéticas), sendo utilizadas inulina, polidextrose e maltodextrina, na proporção de 5,6%, em função da substituição da gordura, e para conferir cremosidade e maciez ao produto. A recomendação mínima estabelecida pela ANVISA para alegação de propriedade funcional é de 5g de inulina na porção diária e 2,5g de fibra solúvel (BRASIL, 2016).

As formulações SWI, SWP, SWM tiveram a inclusão de inulina, polidextrose e maltodextrina, respectivamente. A substituição total de gordura nas formulações não foi possível, pois o WPI utilizado como substituinte de gordura e fonte protéica possuía um teor de 0,9% de gordura em sua composição. A quarta formulação foi o sorvete padrão (SP).

Com base nos teores de sólidos totais e SNGL (sólidos não gordurosos de leite) foi realizado um balanço de massa para a determinação da quantidade de ingredientes necessários para elaboração das formulações de sorvete (Tabela 4) de forma a produzir formulações cujas fontes de variações fossem apenas o teor de gordura e os ingredientes funcionais. Assim, de acordo com os cálculos, todas as amostras foram balanceadas para possuírem 13% (m/m) de SNGL tais como: carboidratos, proteínas, minerais (exceto gordura e água) e 37% de sólidos totais, sendo que tais teores foram determinados a partir de testes preliminares.

Os grãos de *Kefir* foram inoculados na proporção de 5 a 10% (m/m) em leite desnatado UHT (para amostras SWI, SWP e SWM) ou leite integral UHT (para SP) e fermentados por um período de 24h e a seguir a bebida fermentada filtrada (após separação dos grãos) foi transferida para a calda do sorvete contendo os ingredientes e suas proporções descritas na Tabela 4. Após a fermentação por 16h a 24h adicionais ou até atingir pH 4,5, os grãos foram retirados por peneiragem, lavados e mantidos em leite desnatado até uma nova realização de fermentação.

Tabela 4 – Proporção dos ingredientes utilizados em gramas na produção dos sorvetes

Ingredientes	SP	SWI	SWP	SWM
Leite desnatado UHT (g)	-	600	600	600
Leite integral UHT (g)	600	-	-	-
Leite fermentado - <i>Kefir</i> (g)	400	400	400	400
Açúcar (g)	250	-	-	-
Leite em pó integral (g)	100	-	-	-
Creme de leite (g)	120	-	-	-
Isolado protéico (WPI) (g)	-	140	140	140
Inulina (g)	-	80	-	-
Polidextrose (g)	-	-	80	-
Maltodextrina (g)	-	-	-	80
Celulose Microcristalina (g)	-	6	6	6
Maltitol (g)	-	80	80	80
Eritritol (g)	-	80	80	80
Sucralose (g)	-	0,13	0,13	0,13
Emulsificante (g)	10	10	10	10
Estabilizante (g)	10	10	10	10
Saborizante (morango) (g)	20	30	30	30

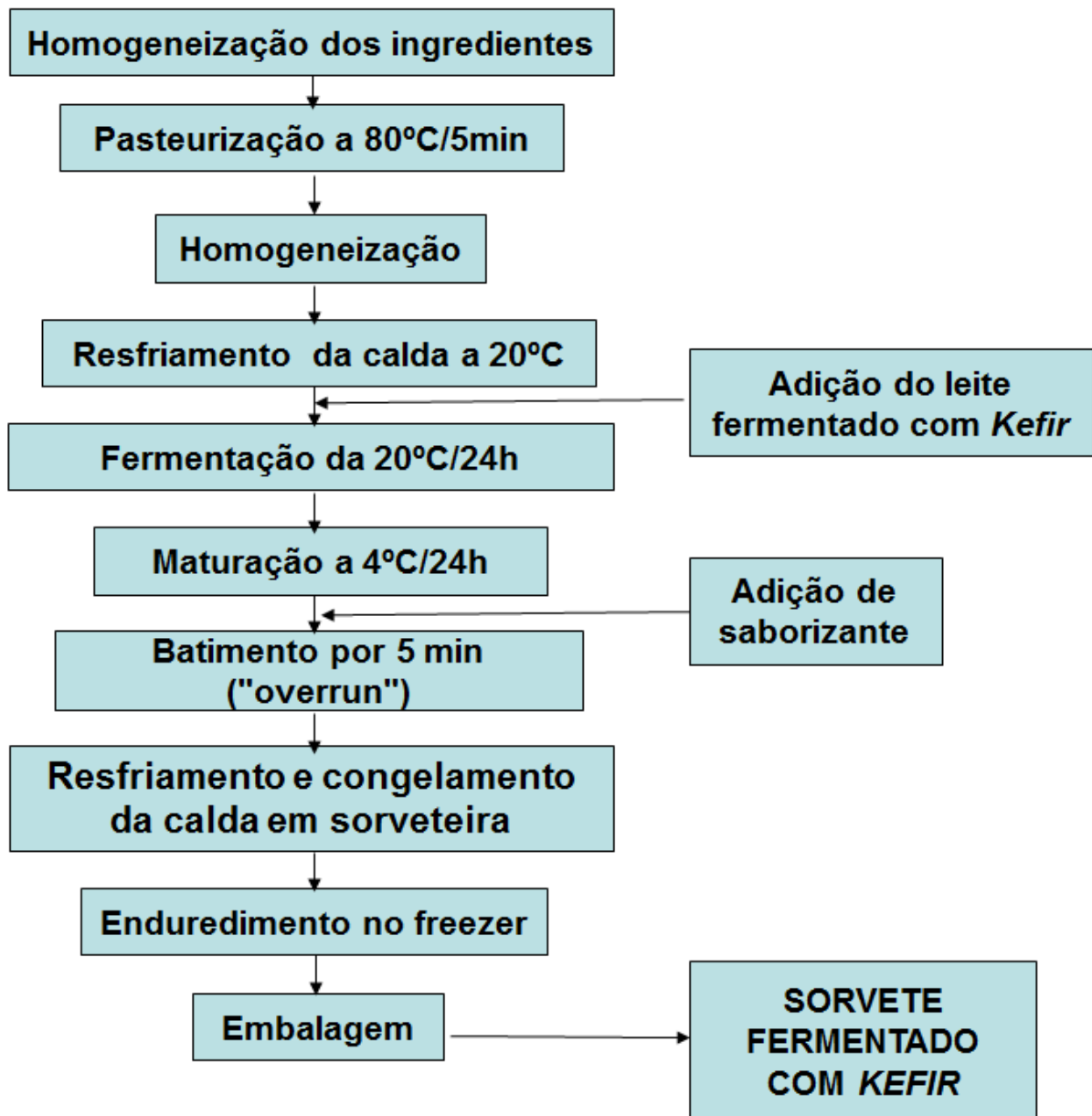
Fonte: o próprio autor

4.3.2 Processamento do Sorvete

A fermentação do leite desnatado UHT com *Kefir* foi realizada 24h antes da produção do sorvete numa proporção de 10% (m/v) de grãos de *Kefir*. Os ingredientes da calda, exceto o Emustab e o saborizante foram homogeneizados em liquidificador doméstico ou em caso de quantidade maior de produção foi utilizado liquidificador semi-industrial, sendo agitados por 5 minutos e a mistura foi pasteurizada à 80°C/5 minutos. A calda foi resfriada até 20°C e recebeu a proporção de 40% (m/m) de leite fermentado com *Kefir*. Esta calda foi fermentada por 24h na mesma temperatura. A calda fermentada foi maturada à temperatura de 4°C por 24h com a finalidade estabilizar a fermentação. Após o período de estabilização homogeneizou-se o Emustab e o saborizante de morango na calda em batedeira planetária por 5 minutos para a incorporação de ar (overrun) e posteriormente

congelou-se a calda à - 20°C na sorveteira (R. Camargo). Os sorvetes foram então acondicionados em embalagens plásticas próprias com capacidade para dois litros e estocados à temperatura de -25°C em freezer horizontal para o endurecimento do produto. As etapas do processamento das amostras de sorvete estão ilustradas na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma da produção de sorvete funcional a base de soro protéico fermentado com *Kefir*



Fonte: o próprio autor

4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Foram determinadas as contagens de *S.aureus*, coliformes totais, coliformes a 45 °C e *E.coli* e pesquisa de *Salmonella spp* nas amostras de sorvete. Para *Salmonella spp* foi utilizado método sugerido por FLOWERS (1992), para *S.aureus* método sugerido por FLOWERS, (1993) e AOAC (1995), e para coliformes e *E.coli* método recomendado por AOAC (2005).

4.4.1 Amostras

Para a realização do experimento foram utilizadas amostras de sorvete fermentado com *Kefir*. A análise de patógenos foi realizada em duplicata após um dia produção.

4.4.2 *Salmonella spp*

Amostras de 10g foram diluídas em 90mL de água peptonada tamponada e realizadas as diluições seriadas, transferindo-se 1mL destes para tubos de ensaio contendo 9mL de água peptonada tamponada, obtendo a diluição 10^{-2} , e assim sucessivamente até a 10^{-6} . As diluições obtidas, foram adicionadas à caldo Rappaport - Vassiliadis (RV) ou Selenito Cistina seg Leifson, como caldos de enriquecimento, e incubados aerobicamente a 35 °C por 24h. Em seguida os cultivos foram semeados com alça bacteriológica por estrias descontínuas (esgotamento) em superfície de placas contendo meio seletivo diferencial Hektoen Enteric Agar e/ou meio Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) ágar, e então incubadas a 35 °C por 24 horas e realizada a pesquisa para confirmação de presença ou ausência. A confirmação das colônias foi feita através da presença de H₂S, fermentação negativa para lactose e colônias pretas (FLOWERS, 1992).

4.4.3 *S. aureus*

Amostras de 10g foram diluídas em 90mL de água peptonada tamponada e realizadas as diluições seriadas, transferindo-se 1mL destes para tubos de ensaio contendo 9mL de água peptonada tamponada, obtendo-se a diluição 10^{-2} , e assim sucessivamente até a 10^{-6} . Das diluições obtidas, foi realizada com alça de Drigalski, a distribuição do inóculo por toda a superfície do meio Baird-Parker, onde foi incubado à 35 °C por 48 horas e realizadas as observações. Foi observada a presença de colônias típicas com formação de uma precipitação e um halo opaco ao redor das colônias de coloração preta pela redução do telurito (FLOWERS, 1992; AOAC, 1995).

4.4.4 Coliformes totais, coliformes a 45 °C e *E.coli*

Amostras de 10g foram diluídas em 90mL de água peptonada tamponada e realizadas as diluições seriadas, transferindo-se 1mL destes para tubos de ensaio contendo 9mL de água peptonada tamponada, obtendo-se a diluição 10^{-2} , e assim sucessivamente até a 10^{-6} . Para coliformes totais, as diluições obtidas foram transferidas para meio Violet Red Bile (VRB), meio seletivo, onde colônias de coloração rosa choque indicam esse grupo. Para continuação do teste para coliformes a 45 °C e *E.coli*, a partir das diluições obtidas, foi transferido 1mL de cada diluição para tubos de ensaio contendo tubos de Durham invertidos contendo caldo lauril sulfato (CLS), sendo incubados a 35 °C por 24-48 horas. O resultado positivo foi a formação de gás no tubo Durham. Sendo positivo, uma alçada de cada tubo com formação gás foi transferida para tubos contendo 10mL de caldo lactosado bile verde brilhante (CLBVB) com tubos de Durham invertidos. O resultado positivo, formação de gás no tubo de Durham, e as contagens após consulta à tabela do Número mais provável (NMP) de coliformes totais por mL ou g do produto.

A partir dos tubos positivos contendo o CLBVB, foi inoculado 1mL em tubos contendo caldo *E. coli* (EC) com tubos de Durham invertidos. O caldo EC retarda o crescimento de outros microrganismos presentes, sendo preferencial para crescimento de *E.coli*. Nesta etapa foi incubado em banho maria a 45 °C por 24-48 horas. O resultado positivo, formação de gás no tubo de Durham, e as contagens

após consulta à tabela NMP novamente para obter o Número Mais Provável de coliformes a 45 °C por mL ou g do produto.

A partir dos tubos positivos contendo o caldo EC, foram semeadas com alça bacteriológica placas contendo meio Eosina azul de metileno (EMB) ou Teague para verificar características ou suspeita de *E.coli*, sendo estes seletivos para o isolamento de bacilos Gram-negativos, apresentando como resultados positivos colônias pretas com ou sem brilho metálico (AOAC, 2005)

4.4.5 *Lactococcus lactis*

A contagem de *Lactococcus lactis spp* foi realizada segundo Irigoyen et al (2005) com algumas modificações. Amostras de 10 g foram diluídas em 90 mL de água peptonada tamponada e realizadas as diluições seriadas, transferindo-se 1mL deste primeiro tubo para tubos de ensaio contendo 9mL de água peptonada tamponada, obtendo-se diluições sucessivas decimais até a 10^{-8} . As diluições foram semeadas em placas contendo agar M17 (pH $7,2 \pm 0,2$), suplementado com nistatina (40.000 UI) (MAGALHÃES et al., 2011). Realizou-se semeadura em profundidade (pour plate) e as placas foram incubadas a 30°C por 48h, em anaerobiose. Para este experimento as contagens foram feitas em duplicata.

O resultado foi expresso em log UFC.g⁻¹ do produto. A confirmação da presença ou não de *L. lactis* foi realizada por teste de PCR seguido de sequenciamento.

As análises foram realizadas imediatamente após a produção dos sorvetes e também decorridos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias posteriores à produção para verificar a viabilidade de *Lactococcus lactis* ou espécies de *Lactobacillus spp* durante este período de armazenamento dos produtos.

4.4.6 Bactérias ácido-lácticas

A contagem de bactérias ácido-lácticas totais foi realizada segundo Garrote, Abraham e Antoni (2001) com modificação. A contagem foi feita em MRS

ágar com incubação a 37°C por 72h sob aerobiose. As avaliações da contagem em meio MRS foram realizadas quinzenalmente até período de 90 dias de estocagem.

4.4.7 Meio seletivo diferencial MRS-maltose e MRS-clindamicina

A enumeração seletiva de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei* foi realizada segundo Tabasco (2007) com modificações. Para obter um meio seletivo diferencial para estas espécies foi realizada misturando-se caldo base MRS isento de glicose enriquecido com 0,2% de Tween 80 e suplementado com 1% de maltose, 0,05% de cisteína, 1,5% de agar (MRS-maltose), e suplementado com nistatina (40.000 UI). As placas foram semeadas por pour-plate com sobrecamada de ágar (sobreposição de camadas) e incubadas a 37°C sob anaerobiose durante 72h.

A enumeração de *Lactobacillus acidophilus* foi realizada segundo Van de Castele (2006). O meio MRS foi suplementado com 0,5ppm de Clindamicina esterilizado por membrana filtrante com 0,22µm de porosidade (MRS-clindamicina), foram semeadas por pour-plate e incubadas a 37°C sob anaerobiose durante 72h.

As avaliações da contagem em MRS-maltose e MRS-clindamicina foram realizadas em duplicata quinzenalmente até período de 90 dias de estocagem.

4.5 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE (PCR)

4.5.1 Linhagens Bacterianas

Após isolamento em placa, as cepas bacterianas (BAL) foram armazenadas em caldo M17 à 5 °C e antes do uso foram reativadas e repicadas em 5 ml de caldo M17 incubados a 30°C por 24h.

Foram selecionados 12 isolados, onde amostras 1 a 3 representam microrganismos no sorvete SWI; amostras 4 a 6 representam SWP, amostras 7 a 10 representam SWM e amostras 10 a 12 representam SP.

4.5.2 Extração de DNA total dos isolados bacterianos

A extração de DNA seguiu protocolo descrito por Barros et al. (2009), com modificações. Alíquotas de 3mL das suspensões bacterianas foram transferidas para tubos de microcentrífuga e as células recuperadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sedimento obtido foi lavado com 1 mL de água peptonada tamponada estéril, e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 500 µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1 mM pH 8,0) contendo 10 µg/mL de proteinase K. As amostras foram incubadas em estufa a 55 °C por 2 horas e posteriormente a 37°C por 30 min. Após o período de lise, o DNA foi extraído com solução de fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1:1). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 5min a 10.000 rpm. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado etanol absoluto refrigerado e mantido a -20°C por 18 horas. Após este período, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, o sedimento foi lavado duas vezes com 50 µl de álcool 70%, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Após as lavagens, o sedimento foi suspenso em 50 µl de água ultrapura e mantido a -20°C até o momento de uso.

4.5.3 Identificação molecular de *Lactobacillus*

A identificação ao nível de gênero foi realizada pela técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) seguindo protocolo descrito por Noohi et al (2014), com modificações. Todas as reações foram realizadas em termociclador Techne-Tc3000, em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL DNA total, 1,0U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10X Tampão da Taq, 2,5mM de MgCl₂, 0,17mM de cada dNTP, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (for-lac 5' - TGGAAACAGGTGCTAATACCG-3'; Revlac 5'-CCATTGTGGAAGATTC-3'). A amplificação foi realizada em termociclador e as condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C à 1 minuto, pareamento a 57°C por 30 segundos, polimerização da sequência alvo a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos. O controle negativo

continha todos os reagentes, exceto o DNA.

4.5.4 Eletroforese em gel de agarose

Aos produtos resultantes da amplificação foram adicionados 5 µL de tampão de amostra Ficoll 400 (Fluka BioChemika, Milwaukee, Wisconsin, EUA) 15%; azul de bromofenol (Synth) 0,25%. Alíquotas de 10 µL dessa mistura foram analisadas em gel de agarose (Pronadisa, Madrid, Espanha) a 1,0% acrescidos de 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000x em DMSO (Invitrogen). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com tampão Tris borato EDTA [Tris (Invitrogen) 45 mM; ácido bórico (Nuclear) 45 mM, EDTA (Nuclear) 1,25 mM] a 70 V durante 1 h. Como marcador de massa molecular, foi utilizado DNA de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os produtos de amplificação foram visualizados por luz UV em transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia Molecular, Cotia, São Paulo, Brasil). O gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação L.Pix Image Versão 1.21 (Loccus Biotecnologia Molecular).

O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de peso molecular (1 KB DNA plus ladder) (Amersham Pharmacia Biotech).

4.5.5 Identificação da espécie por Sequenciamento

Após o PCR, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento no ACTGene Análises Moleculares Ltda, localizado na cidade Alvorada - RS. Estes isolados tiveram o gene 16S rRNA sequenciado utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram verificadas utilizando o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) do BLAST 2.0 (Basic Locus Alignment Search Tool) para a comparação com as sequências depositadas no GenBank (Apêndice B)

4.6 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

4.6.1 Análise Físico-Química para Ingredientes e Sorvetes

O isolado protéico de soro (IPS) e o leite desnatado representam aproximadamente 80% do peso total da formulação. As análises físico-químicas foram realizadas segundo descritas por (IAL, 2008).

As análises para determinação da composição centesimal das amostras de sorvete foram: determinação de sólidos totais, cinzas, proteínas e gorduras. A determinação de sólidos totais foi realizada por evaporação de água a 105°C e a determinação de cinzas obtida por eliminação de matéria orgânica a 550°C (AOAC, 1995). O percentual de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) e o percentual de gorduras pelo método de Rose-Gottlieb.

Com os resultados obtidos foi feito o cálculo da quantidade aproximada de carboidratos e do valor energético do produto, estimado a partir da fração do extrato não nitrogenado (NIFEXT), ou seja, compreende os carboidratos mais digestíveis, que não estão incluídos na fração fibras, subtraindo-se a soma dos demais constituintes de 100. A diferença foi expressa como a parcela de carboidratos para 100g do produto. Para o cálculo do valor energético, foram considerados através dos resultados das análises de carboidratos, proteínas e gordura, onde foi estimado o valor calórico do produto, considerando-se proteínas, gorduras e carboidratos como aportando, 4, 9 e 4 Kcal/g, respectivamente. Também foram considerados os valores energéticos da inulina, polidextrose, maltodextrina, eritritol e maltitol, sendo 1,2 Kcal/g, 1 Kcal/g, 3,84 Kcal/g, 0,2 Kcal/g, 2 Kcal/g, respectivamente, conforme informação descrita nas respectivas fichas técnicas. O resultado foi expresso em kcal/100g de produto.

O teor de lactose foi determinado pelo método de Fehling (IAL, 2008).

4.6.2 “Overrun”

O “*overrun*” foi calculado pela diferença entre o peso do sorvete e o peso da calda dividido pelo volume da calda, multiplicado por 100 (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003). Esta análise foi realizada em triplicata.

4.6.3 pH

O pH das amostras foi medido diretamente pela introdução do eletrodo do potenciômetro em alíquotas de 10 mL do sorvete (calda), à temperatura ambiente (IAL, 2008). Foi realizada em triplicata.

4.6.4 Acidez em ácido láctico

A acidez foi determinada por titulação potenciométrica. Pesou-se dez gramas da amostra em um béquer contendo 10 mL de água isenta de gás carbônico, e cinco gotas de fenolftaleína. Titulou-se, sob agitação, com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até atingir pH 8,3 (IAL, 2008). A acidez titulável foi calculada utilizando a equação 1:

$$AT (\%) = \frac{V \times f \times 0,9}{P} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

V – volume, em mL, de solução de NaOH 0,1 M/L gasto na titulação;

f – fator de correção da solução de NaOH 0,1 M/L;

0,9 – fator de conversão para ácido láctico;

P – massa, em gramas, da amostra.

O resultado para a acidez foi expresso em percentagem de ácido láctico (g de ácido láctico/100g de produto). A análise foi realizada em triplicata.

4.7 ANÁLISE SENSORIAL

Os testes sensoriais foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, cujas instalações incluem cabines individuais, controle de iluminação e temperatura ambiente. Para avaliação, 30g de cada amostra a -5°C foram servidos em copos de plástico descartáveis, codificados com números aleatórios de três dígitos. Foi solicitado aos provadores que enxugassem a boca com porções de água à temperatura ambiente, antes e entre uma formulação e outra, e preenchessem as fichas de análise sensorial após o consumo.

A análise sensorial foi realizada por um teste afetivo de aceitação, de acordo com métodos descritos por Lawless e Heymann (2010).

A equipe sensorial foi composta por 70 julgadores não treinados, consumidores potenciais do produto com idade variando de 18 a 50 anos, entre estudantes, docentes e servidores.

4.7.1 Teste Afetivo de Aceitação

O estudo foi conduzido somente após análise microbiológica de Coliformes a 45 °C, *Salmonella spp* e *E.coli*, para garantir a inocuidade do produto. A análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE 21645813.2.0000.5231- ver anexo 1)

Para o teste afetivo de aceitação foram avaliados cinco atributos: aparência (aspecto), sabor, odor, textura, cor e nota global, onde os sorvetes foram avaliados segundo o teste de aceitabilidade por escala hedônica estruturada verbal de nove pontos, contendo termos definidos situados entre “gostei muitíssimo” (9) e “desgostei muitíssimo” (1), e um ponto intermediário com o termo “não gostei, nem desgostei” (5) (STONE; SIDEL, 2004). A intenção de consumo dos sorvetes foi estimada através de uma escala de atitude contendo termos definidos situados entre “comeria sempre” (9) e “nunca comeria” (1), e um ponto intermediário com o termo

“comeria ocasionalmente” (5). A ficha conforme utilizada é apresentada na Apêndice E.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise físico-química, análise microbiológica e teste afetivo de aceitação, os dados foram tratados por Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparação de média de Tukey com nível de significância de 5 %.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Para a formulação foram determinados os teores de carboidratos, proteína, lipídeos, cinzas, umidade, sólidos totais, pH dos principais ingredientes e apresentados na Tabela 5. Foram analisados somente o isolado protéico de soro e o leite desnatado, pois estes são ingredientes dos sorvetes que representam aproximadamente 80% do peso total da formulação.

Tabela 5 - Composição físico-química média dos ingredientes majoritários

Ingrediente	Sólidos Totais (%)	Carboidratos (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)	pH
Isolado							
Protéico de Soro	96,90±0,09	2,2±0,02	91,0±0,17	1,0±0,06	2,70±0,04	3,10± 0,09	6,81±0,04
Leite Desnatado	8,77±0,42	5,0±0,36	3,2±0,07	0,4±0,00	0,17±0,01	91,23±0,42	6,74±0,02

* Resultados expressos em percentual. Médias ± desvio padrão

A composição centesimal dos ingredientes utilizados na formulação dos sorvetes, quais sejam: o isolado protéico de soro e leite desnatado apresentou resultados compatíveis com a informação dada pelos seus fornecedores, estando em conformidade com a quantidade pretendida na composição centesimal do produto final (Anexo 7).

Para a definição da composição química das amostras de sorvete funcional, foram determinados os teores de carboidratos, proteína, lipídeos, cinzas, umidade, sólidos totais (Tabela 6), pH, acidez e lactose (Tabela 7).

Tabela 6 - Composição físico-química das amostras de sorvete padrão e sorvetes funcionais

Formulação	Sólidos Totais (%)	Carboidratos (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
SP	33,91 ± 0,38 ^b	22,62 ± 0,15 ^b	3,72 ± 0,08 ^c	7,450 ± 0,14 ^a	0,119 ± 0,01 ^b	66,09 ± 0,38 ^a
SWI	35,96 ± 0,19 ^a	23,25 ± 0,01 ^{ab}	11,80 ± 0,16 ^a	0,448 ± 0,01 ^b	0,465 ± 0,01 ^a	64,03 ± 0,17 ^b
SWP	36,06 ± 0,21 ^a	24,00 ± 0,09 ^a	11,16 ± 0,06 ^b	0,439 ± 0,04 ^b	0,461 ± 0,02 ^a	63,94 ± 0,21 ^b
SWM	35,70 ± 0,40 ^a	23,35 ± 0,59 ^{ab}	11,43 ± 0,12 ^b	0,441 ± 0,06 ^b	0,484 ± 0,01 ^a	64,30 ± 0,40 ^b

*Resultados expressos em percentual. Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras minúsculas iguais, na coluna, não diferem a $p \leq 0,05$. SP = Sorvete Padrão; SWI = Sorvete com Inulina; SWP = Sorvete com Polidextrose; SWM = Sorvete com Maltodextrina

O teor de sólidos totais, das amostras SWI, SWP e SWM não apresentou diferença significativa, somente amostra SP apresentou menor quantidade. Embora a concentração de sólidos seja similar quantitativamente, a substituição de sólidos gordurosos por proteína foi efetiva com redução significativa dos teores de gordura nas formulações. O teor de sólidos das amostras não diferiu muito daquele verificado para alguns produtos similares descritos na literatura (sorvetes), cujos valores variaram de 32,33 a 39,00% (ORDONEZ et al., 2000). Entende-se por sólidos totais o somatório de todos os componentes não-aquosos do sorvete, ou seja, todos os componentes sólidos exceto a água, que geralmente contribuem com o valor nutricional, a viscosidade e melhoram a textura e o corpo do produto final, porém em concentrações excessivas (40-42%), o produto final apresenta-se pesado e duro (SOLER; VEGIA, 2001).

Os teores de carboidratos entre as amostras SWI, SWP e SWM não diferiram significativamente, e o SWP apresentou diferença em relação ao SP. Estes valores apresentam-se um pouco inferiores à média dos produtos disponíveis comercialmente devido ao incremento proporcionado pela alta concentração de proteínas no sorvete. Porém as matérias-primas utilizadas, em especial a inulina, polidextrose, que são polímeros de frutose e glicose, respectivamente, são consideradas fibras dietéticas, ou seja, possuem baixa concentração de açúcares, e os sorvetes comerciais apresentam em grande parte os carboidratos na forma de açúcares (DUTRA de OLIVEIRA, 1982).

No tocante ao teor de proteínas das amostras analisadas, exceto para a amostra padrão, os valores variaram de 11,16 a 11,80% e foi verificada

diferença significativa da amostra SWI para as amostras SWP e SWM, enquanto o sorvete padrão (SP), apresentou teor de 3,72%, diferindo significativamente das demais amostras. Tieszen e Baer (1989) estudaram e desenvolveram algumas amostras de sorvete de iogurte e efetuaram uma comparação destas com amostras disponíveis comercialmente, onde os teores de proteínas destes produtos foram bem superiores aos teores verificados nos sorvetes de iogurte regularmente encontrados no mercado, devido à utilização de leite ultrafiltrado como matéria-prima.

Duas amostras de sorvete comerciais regionais da cidade de Londrina - PR apresentaram teores de 3,52% e 3,83% de proteínas nas respectivas informações nutricionais, enquanto que, neste estudo, os teores foram superiores a 11% (m/v). Neste trabalho foi utilizado o isolado protéico de soro, onde o sorvete desenvolvido pode ser considerado como um produto com propriedades funcionais proporcionados pelos aminoácidos e componentes biológicos presentes, assim aumentando o teor de proteínas do sorvete, e este ingrediente tem muito baixo teor de lactose, evitando o defeito tecnológico dos cristais de lactose, muito comuns em sorvetes. Dentre as propriedades funcionais do isolado protéico de soro, pode-se citar: são proteínas de fácil digestão, possuem alta absorção intestinal, alto valor biológico por conter aminoácidos essenciais para formação da síntese protéica e importantes para a manutenção do músculo e outros tecidos, baixo teor de gordura, (HARAGUCHI, 2006; NAUM, 2010),

O teor de lipídeos não apresentou diferença significativa entre as amostras SWI, SWP e SWM, variando de 0,439 a 0,448%, e o SP apresentou teor de 7,45%, diferindo significativamente das outras amostras. No presente trabalho a gordura foi substituída por isolado protéico de soro com inulina, polidextrose ou maltodextrina, ingredientes alimentares que conferem ótima textura e cremosidade com o diferencial de conferir ao produto um teor de lipídeos inferior aos sorvetes já existentes no mercado, que apresentam em suas formulações a utilização de gordura vegetal. Com estas quantidades de gordura apresentadas, os sorvetes desenvolvidos podem ser considerados produtos para dietas com restrição de gordura, produtos diet, pois estes podem conter no máximo 0,5g de gordura total por 100g ou 100mL do produto final a ser consumido, ou seja, 0,5% de gordura (SOLER; VEIGA, 2001). Em sorvetes convencionais comerciais do Brasil, geralmente o conteúdo de gordura está em torno de 8%, variando até 12%, (SOLER; VEIGA, 2001; ABIS, 2012). Em dois sorvetes comerciais da região de Londrina - PR, as

tabelas nutricionais informam que o conteúdo de gordura está em torno de 12 a 12,5%, indicando que neste estudo, foi possível desenvolver sorvete funcional com teor reduzido de gorduras. O interesse do consumidor por produtos com teor reduzido de gordura, incentiva a aplicação de ingredientes alimentares funcionais nestes produtos, que deste modo, podem contribuir para a diminuição de doenças crônico-degenerativas (DEVEREUX et al., 2003; AKALIN et al., 2007)

Quanto aos resultados para o conteúdo mineral encontrado nas amostras com reduzido teor de gordura a variação foi de 0,461 a 0,484%, não havendo diferenças significativas entre as amostras, somente o SP apresentou teor de 0,119%. Estes valores foram similares aos verificados para o leite e leites fermentados (TAMINE; ROBINSON, 1985). A maior quantidade de minerais é devida à utilização do isolado protéico de soro, que em sua composição possui altos teores de cálcio, fósforo e potássio em relação ao leite integral, e por sua vez, o sorvete padrão, onde não foi utilizado isolado proteico apresentou menor quantidade de minerais.

5.1.1. Índices de ácido láctico, pH e Lactose

Os valores de acidez, pH e lactose estão apresentados na Tabela 7. Após o processo de fermentação pela cultura de *Kefir*, pôde-se constatar que as formulações de sorvete funcionais desenvolvidos atingiram valor em torno de pH 5, no período de 24 horas de incubação a 20°C. Resultados semelhantes foram relatados por Frighetto (2012).

Tabela 7 – Acidez titulável, pH e Lactose do Sorvete Padrão e Sorvetes Funcionais ao longo de 90 dias de estocagem à -18°C

Análise	Tempo (Dias)	Formulações			
		SP	SWI	SWP	SWM
Acidez titulável (g/ 100g)	Sem fermentação	0,17 ± 0,01 ^{ba}	0,12 ± 0,01 ^{cb}	0,13 ± 0,01 ^{cb}	0,12 ± 0,01 ^{cb}
	1	0,45 ± 0,01 ^{aa}	0,37 ± 0,01 ^{bb}	0,37 ± 0,01 ^{bb}	0,34 ± 0,01 ^{bc}
	30	0,47 ± 0,03 ^{aa}	0,42 ± 0,01 ^{ab}	0,41 ± 0,02 ^{ab}	0,38 ± 0,01 ^{ab}
	60	0,47 ± 0,02 ^{aa}	0,40 ± 0,01 ^{abc}	0,43 ± 0,01 ^{ab}	0,38 ± 0,02 ^{ad}
	90	0,54 ± 0,05 ^{aa}	0,41 ± 0,02 ^{ab}	0,43 ± 0,03 ^{ab}	0,37 ± 0,04 ^{ab}
pH	Sem fermentação	6,78 ± 0,08 ^{aA}	6,93 ± 0,03 ^{aB}	6,94 ± 0,03 ^{aB}	6,97 ± 0,01 ^{aB}
	1	5,06 ± 0,02 ^{ba}	5,30 ± 0,02 ^{bb}	5,32 ± 0,03 ^{bb}	5,41 ± 0,01 ^{bc}
	30	4,98 ± 0,11 ^{bcA}	5,21 ± 0,02 ^{cb}	5,19 ± 0,02 ^{cb}	5,28 ± 0,01 ^{cc}
	60	4,84 ± 0,03 ^{cdA}	5,20 ± 0,02 ^{cb}	5,17 ± 0,02 ^{cb}	5,30 ± 0,01 ^{cc}
	90	4,85 ± 0,01 ^{cdA}	5,19 ± 0,01 ^{cb}	5,17 ± 0,03 ^{cb}	5,27 ± 0,01 ^{cc}
Lactose (%)	Sem fermentação	6,28 ± 0,09 ^{aA}	3,47 ± 0,03 ^{aB}	3,44 ± 0,04 ^{aB}	3,45 ± 0,02 ^{aB}
	1	3,22 ± 0,04 ^{ba}	1,77 ± 0,01 ^{bb}	1,75 ± 0,01 ^{bc}	1,82 ± 0,02 ^{bBC}
	30	3,20 ± 0,02 ^{ba}	1,65 ± 0,03 ^{cc}	1,64 ± 0,05 ^{cc}	1,77 ± 0,01 ^{bcB}
	60	3,19 ± 0,01 ^{ba}	1,67 ± 0,01 ^{cc}	1,66 ± 0,03 ^{cc}	1,75 ± 0,03 ^{cb}
	90	3,21 ± 0,03 ^{ba}	1,64 ± 0,03 ^{cc}	1,64 ± 0,02 ^{cc}	1,74 ± 0,04 ^{cb}

Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras minúsculas iguais, na coluna, não diferem a $p \leq 0,05$. Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras maiúsculas iguais, na linha, para cada formulação, não diferem significativamente a 5%. SP = Sorvete Padrão; SWI = Sorvete com Inulina; SWP = Sorvete com Polidextrose; SWM = Sorvete com Maltodextrina

Para as amostras SWI, SWP, SWM, houve diminuição significativa nos valores de pH após a fermentação à 20 °C por 24 horas e depois dos 30 dias de armazenamento, sem alterar significativamente após este período. Os valores de lactose das amostras SWI e SWP diminuíram significativamente após a fermentação e após 30 dias de estocagem, e SWM diminuiu após a fermentação e após 60 dias. A acidez, nas amostras SWI, SWP e SWM aumentou significativamente após a fermentação e após os 30 dias. Para o SP, os valores de acidez apresentaram diferença significativa somente na fermentação, não diferindo seus valores ao longo dos 90 dias de estocagem, igualmente ocorreu para o teor lactose do SP. Houve uma diminuição no valor de pH que foi significativa para o SP após 60 dias. Os índices de ácido láctico, pH e lactose mantiveram-se estáveis entre 30 e 90 dias de armazenamento.

Durante todo o período de fermentação da calda, realizou-se o acompanhamento do pH, em intervalos de aproximadamente 12 horas, e estes variaram de 5,5 a 5,7. A redução do pH é consequência da atividade metabólica de bactérias lácticas, indicando, a adequação do meio (substrato) ao seu desenvolvimento. Valores baixos de pH podem favorecer um determinado grupo bacteriano em detrimento de outro. No caso da fermentação do iogurte, bactérias do gênero *Lactobacillus* crescem e toleram valores de pH mais baixos do que as pertencentes ao gênero *Streptococcus* (TAMIME; ROBINSON, 1991).

Sorvetes probióticos normalmente mantêm um pH superior à 4,6, característico de leites fermentados, uma vez que são armazenados sob temperaturas baixas, minimizando as reações bioquímicas associadas à atividade microbiana (CRUZ et al., 2011).

Segundo Irigoyen et al. (2005), o pH da bebida fermentada com grãos de *Kefir* não varia durante o período de armazenamento. O decréscimo de pH ocorre apenas durante o processo de fermentação, que pode ser justificado pela degradação da lactose, resultante da ação das bactérias presentes nos grãos, e na estocagem, a produção de ácido láctico diminuiu devido ao declínio da população de bactérias ácido-lácticas na bebida, porém em iogurte, o pH diminui com o tempo de estocagem refrigerado devido à hidrólise da lactose pelas bactérias fermentadoras. Para os autores, o pH do *Kefir* não variou durante a estocagem, devido a presença de leveduras. A presença de leveduras nos grãos ou culturas faz com que as bactérias ácido-lácticas se multipliquem mais lentamente e produzam ácido láctico em baixa concentração (IRIGOYEN et. al., 2005). No presente estudo não foi verificado tal efeito das leveduras nas amostras.

A diminuição do pH e o aumento da acidez durante o período de armazenamento são resultado da pós-acidificação dos produtos e estão relacionados à continuidade do processo fermentativo pelas bactérias ácido-lácticas durante este período com produção de ácido láctico (APORTELA-PALACIOS et al., 2005). Porém, neste trabalho os produtos sofreram congelamento e não houve posterior desenvolvimento das bactérias e, portanto, uma estabilização do pH e acidez.

Farnworth e Mainville (2008) relatam que pelo menos 30% da lactose são hidrolisados durante a fermentação e o processo continua durante o período de armazenamento refrigerado. No presente estudo houve um consumo

médio de 48 a 50% da lactose inicial. É importante ressaltar que os produtos foram congelados e essa leve diminuição no teor de lactose e pH, e aumento de ácido láctico após 30 dias de estocagem, pode ser devido a adaptação das BAL do *Kefir* (que possui uma microbiota complexa) às condições de armazenamento à -18°C, que após este período, a atividade metabólica destas bactérias foi praticamente nula. A aplicação de fibras e prebióticos pode ter agido como crioprotetores, e auxiliado como substrato para as bactérias continuarem a fermentação até a adaptação total ao congelamento. Segundo Frighetto (2012), os índices de ácido láctico mantiveram-se estáveis entre 30 e 90 dias de estocagem, sugerindo que após um período de adaptação em condições de congelamento cessou a atividade metabólica de *L. paracasei* no sorvete.

Segundo os autores, o pH do sorvete próximo à neutralidade, variando de 5,5 a 6,5 permite a possibilidade de sobrevivência de microrganismos probióticos durante o armazenamento. Além disso, índices de acidez mais baixos resultam em aumento da aceitação do consumidor, especialmente por aqueles que preferem produtos leves (CRUZ et al. 2009).

Garcia Fontán et al. (2006) verificaram que a lactose diminui nas primeiras 24 horas de fermentação do *Kefir*, seguido de decréscimo da hidrólise durante o período de estocagem. Segundo os autores, não foi possível detectar a quantidade de glicose e galactose nas amostras durante a fermentação, e foi sugerido que esses monossacarídeos produzidos durante o processo de fermentação pela degradação da lactose são imediatamente metabolizados em outros produtos como ácido láctico, etanol e CO₂ e não são acumulados na bebida. Segundo Irigoyen et al. (2005), a galactose formada pela hidrólise da lactose é usada pela microbiota dos grãos de *Kefir* para produzir o *Kefiran* durante o processo de fermentação.

Cardarelli et al. (2008) observaram que queijos petit-suisse tradicional apresentavam menor pH que os simbióticos. Durante o período de estocagem os autores verificaram que mais lactose podia ser degradada a ácidos orgânicos, levando ao menor pH. Uma maior concentração de lactose provê o microrganismo de maior quantidade de substrato a ser degradado em ácidos orgânicos, levando a menor pH e maiores valores de acidez durante a estocagem. Tal fato ocorreu com sorvete padrão (SP) devido ao maior teor de lactose em sua formulação em relação às outras formulações e ausência de ingredientes prebióticos

ou fibras. Há que se considerar a presença de proteínas que exercem um efeito tampão, no caso das amostras com isolado protéico de soro.

Segundo Modler et al. (1983), iogurtes com maiores porcentagens de proteína, principalmente proveniente da adição de leite em pó desnatado, são menos ácidos devido à capacidade tamponante das proteínas. No estudo de Montanucci (2010), as amostras de bebidas de *Kefir* sem inulina apresentaram maiores teores de proteína e também maiores valores de pH.

5.2 INCORPORAÇÃO DE AR (OVER RUN)

Para o "overrun" foi determinada a média de 3 repetições por amostra. Os valores de "overrun" para os sorvetes desenvolvidos com inulina, polidextrose, e maltodextrina, foram de 118,4%, 132,14% 82,92%, respectivamente, e para o sorvete padrão foi de 104,33%. Segundo a ANVISA (2000), a quantidade mínima de ar incorporado ao sorvete (overrun) mediante batimento é expressa em densidade aparente de 475g/L, um rendimento de 110,52%. Essa variação no rendimento do sorvete pode ser devida à sorveteira, uma máquina tecnicamente denominada "artesanal", o que não permite o controle de incorporação de "overrun", ou seja, da quantidade de ar incorporada à massa. Neste estudo, a amostra desenvolvida com a maltodextrina apresentou uma porcentagem de overrun menor do que a mínima estabelecida pela legislação, que também pode ser devido a maltodextrina atuar como agente espessante e não como emulsificante (CHRONAKIS, 1998).

5.3 CALORIAS

Neste estudo foram utilizados polióis maltitol e eritritol, que possuem baixas calorias, com a finalidade de substituir o açúcar e diminuir o valor das calorias dos sorvetes desenvolvidos. Foram utilizados também a inulina, polidextrose e maltodextrina, com a finalidade de substituir a gordura do sorvete, e também diminuir o valor energético, pois lipídeos possuem mais calorias por grama.

De acordo com a Tabela 8, as amostras SWI, SWP e SWM apresentaram valores energéticos de 99,2, 95,6 e 110,8 kcal/100g, respectivamente, valor consideravelmente abaixo em relação à amostra SP, que foi de 172,5 kcal/100g. A amostra SP apresentou valor de calorias semelhante ao encontrado no comércio, como por exemplo a marca A informa em sua embalagem que seu produto possui 183,3 kcal/100g de calorias, e marca B com valor de 205 kcal/100g, produtos encontrados no comércio local.

Tabela 8 - Valor energético médio de 4 formulações de sorvete

Formulação	Calorias (Kcal/100g)
SP	172,5
SWI	99,2
SWP	95,6
SWM	110,8

SP = Sorvete Padrão; SWI = Sorvete com Inulina; SWP = Sorvete com Polidextrose; SWM = Sorvete com Maltodextrina

Contudo, pode-se afirmar que os sorvetes funcionais desenvolvidos fermentados por *Kefir* possuem quantidade de calorias consideravelmente inferiores ao sorvete padrão e sorvete comercial, cerca de 36 a 45% menos calorias, sendo considerados produtos de baixa caloria e funcionais.

5.4 ALEGAÇÃO PARA PROPRIEDADES FUNCIONAIS

A mais recente Resolução da Gerência Geral de Alimentos (GGALI) da Anvisa (BRASIL 2016) impôs novas regras e comprovações para que alegações possam ser feitas com relação a produtos contendo probióticos ou prebióticos. Neste caso o produto é funcional, contém FOS que a partir de março de 2016 constam como prebióticos na nossa legislação e com comprovada ação benéfica na literatura internacional.

Para a inulina, a alegação de prebiótico pode ser utilizada desde que a recomendação de consumo diário do produto pronto para consumo forneça no mínimo 5g de inulina. A porção deve fornecer no mínimo 2,5g de inulina. E para a

polidextrose, a alegação de fibra alimentar pode ser utilizada desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 2,5g de polidextrose.

De acordo com Brasil (2003), uma porção de sorvete equivale a 60g (1 bola de sorvete). A quantidade presente nesta porção de 60g de sorvete possui 3,38g de inulina, estando dentro dos limites da legislação. Para alegar que os produtos funcionais contribuam para o equilíbrio da microbiota intestinal e apresentem atividade prebiótica, o consumidor necessitaria ingerir 88,76g de sorvete. E para alegação de fibra alimentar, na porção de 60g o sorvete possui 5,63g de polidextrose, estando acima do limite mínimo decretado pela legislação.

5.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA: PATOGÊNICOS

Antes de que os julgadores experimentassem os sorvetes fermentados com *Kefir*, os produtos deveriam estar inócuos ou seja não oferecendo riscos ao provadores e com isso foram feitos os testes para *Salmonella*, coliformes 45°C, *E. coli* e *S.aureus*.

No presente estudo, para os coliformes totais, coliformes a 45°C foram encontrados Número Mais Provável (NMP) inferiores aos que a legislação determina, e *S. aureus* ausentes em todas as formulações um dia após o término da produção do sorvete, ou seja, com um dia de estocagem. Também não houve contaminação por *Salmonella spp* estando ausente em 25g do produto.

5.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA: CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Para as contagens de bactérias ácido-lácticas na presença de fungos que também compõem a microbiota dos grãos de *Kefir* foi utilizado o antifúngico nistatina. A nistatina na concentração utilizada (40.000 UI) foi eficiente na inibição do crescimento de leveduras e mofos, e todas as contagens nos meios MRS e M17 puderam ser realizadas sem contaminação fúngica (testes preliminares e dados não mostrados). Os resultados do número de bactérias ácido-lácticas e potenciais probióticos (*Lactococcus lactis*) viáveis nas amostras de sorvete são

apresentados na Tabela 9, onde foram calculados a partir de 3 partidas de cada amostra.

Tabela 9 – Contagem de bactérias ácido-lácticas nas diferentes formulações de sorvetes funcionais ao longo de 90 dias de estocagem a -18°C

Meios	Tempo (Dias)	Formulações				
		SWI	SWP	SWM	SP	Média
M17	1	8,45 ± 0,05 ^{aA}	8,31 ± 0,04 ^{aAB}	8,40 ± 0,01 ^{aAB}	8,10 ± 0,14 ^{aB}	8,32 ^a
	15	8,45 ± 0,01 ^{aA}	8,45 ± 0,12 ^{aA}	8,39 ± 0,06 ^{aA}	8,13 ± 0,13 ^{aA}	8,36 ^a
	30	8,49 ± 0,03 ^{aA}	8,35 ± 0,11 ^{aA}	8,40 ± 0,03 ^{aA}	8,08 ± 0,20 ^{aA}	8,29 ^a
	45	8,47 ± 0,03 ^{aA}	8,29 ± 0,21 ^{aAB}	8,31 ± 0,15 ^{aAB}	7,80 ± 0,28 ^{abB}	8,24 ^a
	60	8,43 ± 0,02 ^{aA}	8,42 ± 0,11 ^{aA}	8,35 ± 0,01 ^{aA}	7,30 ± 0,30 ^{bB}	8,21 ^a
	75	8,41 ± 0,07 ^{aA}	8,45 ± 0,17 ^{aA}	8,37 ± 0,01 ^{aA}	7,45 ± 0,02 ^{bB}	8,15 ^a
	90	8,40 ± 0,06 ^{aA}	8,34 ± 0,02 ^{aA}	8,39 ± 0,02 ^{aA}	7,32 ± 0,03 ^{bB}	8,12 ^a
Média		8,444 ^a	8,372 ^a	8,375 ^a	7,784 ^b	
MRS	1	8,46 ± 0,02 ^{aA}	8,40 ± 0,04 ^{aA}	8,31 ± 0,04 ^{aA}	8,33 ± 0,04 ^{aA}	8,38 ^a
	15	8,40 ± 0,02 ^{aA}	8,40 ± 0,08 ^{aA}	8,38 ± 0,02 ^{aA}	8,33 ± 0,07 ^{aA}	8,38 ^a
	30	8,40 ± 0,04 ^{aA}	8,40 ± 0,06 ^{aA}	8,39 ± 0,02 ^{aA}	8,29 ± 0,09 ^{aA}	8,37 ^a
	45	8,39 ± 0,07 ^{aA}	8,35 ± 0,07 ^{aA}	8,36 ± 0,08 ^{aA}	8,35 ± 0,07 ^{aA}	8,36 ^a
	60	8,45 ± 0,00 ^{aA}	8,43 ± 0,07 ^{aA}	8,41 ± 0,01 ^{aA}	8,40 ± 0,02 ^{aA}	8,42 ^a
	75	8,34 ± 0,03 ^{aA}	8,34 ± 0,05 ^{aA}	8,37 ± 0,13 ^{aA}	8,37 ± 0,10 ^{aA}	8,35 ^a
	90	8,40 ± 0,02 ^{aA}	8,35 ± 0,04 ^{aA}	8,40 ± 0,08 ^{aA}	8,30 ± 0,03 ^{aA}	8,36 ^a
Média		8,406 ^a	8,383 ^{ab}	8,375 ^{ab}	8,340 ^b	

*Resultados expressos em log UFC g⁻¹. Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras minúsculas iguais, na coluna, não diferencia estatisticamente, no nível de $p \leq 0,05$. Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras maiúsculas iguais, na linha, para cada formulação, não diferencia estatisticamente, no nível de $p \leq 0,05$. Ágar MRS suplementado com nistatina, incubado a 37 °C sob aerobiose = contagem de bactérias ácido-lácticas, ágar M17 suplementado com nistatina, incubado a 30 °C sob anaerobiose = seletivo para *Lactococcus spp*; médias de 3 partidas de cada amostra. SP = Sorvete Padrão; SWI = Sorvete com Inulina; SWP = Sorvete com Polidextrose; SWM = Sorvete com Maltodextrina

Neste estudo, bactérias ácido-lácticas (BAL) apresentaram crescimento na formulação dos sorvetes e manutenção dos números após congelamento.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 9, é possível observar ao longo de 90 dias de armazenamento que as formulações com inulina (SWI), polidextrose (SWP) e maltodextrina (SWM) não apresentaram diminuição

significativa ($p < 0,05$) na contagem das células viáveis de BAL e contagens em M17. Houve, porém, diferença significativa na formulação do sorvete padrão (SP) para M17, onde ocorreu uma redução da ordem de menos que um ciclo logarítmico ao longo do período após 45 dias de estocagem, na contagem de células viáveis. Entretanto apesar dessa redução, a contagem ainda esteve próxima a 10^7 UFC/g, preservando, assim, a condição para ser considerado um produto com potencial probiótico e funcional (KIM, 1998; MATTILA – SANDHOLM et al., 2002). Porém, se o consumidor ingerisse apenas 10g do sorvete, a contagem de células viáveis estaria a 10^8 UFC/g.

Uma possível justificativa para essa diminuição de células viáveis na amostra padrão, é que a adição de inulina em produtos lácteos, pode auxiliar na sobrevivência e estabilidade de microrganismos probióticos empregados devido às suas propriedades crioprotetoras, auxiliando na redução da formação de cristais de gelo durante as possíveis oscilações de temperatura que podem ocorrer durante o armazenamento dos produtos (AKALIN e ERISIR, 2008). Porém, no presente estudo, não foi verificada a influência significativa de prebióticos, como inulina e fibra alimentar como polidextrose, sobre o desenvolvimento de bactérias ácido-lácticas, portanto, não é possível atribuir a estes ingredientes as taxas maiores de sobrevivência da população em estudo, somente levantando-se hipóteses destes polissacarídeos terem protegido fisicamente as células durante o armazenamento. Nas contagens de bactérias ácido-lácticas em MRS, em todas as formulações de sorvete não houve diminuição significativa na viabilidade a nível de 5 %. Em relação ao período de 90 dias, as quatro formulações não apresentaram diminuição na viabilidade, garantindo que os sorvetes desenvolvidos possuam quantidade suficiente de bactérias ácido-lácticas para ser considerado como um produto contendo microrganismos vivos com potencial probiótico e funcional também.

As condições de armazenamento de sorvete de iogurte não são consideradas ideais para a sobrevivências de bactérias lácticas. O processo de congelamento dos produtos pode causar a redução de $\frac{1}{2}$ a 1 ciclo logarítmico na contagem das células viáveis segundo Davidson et al. (2000).

Davidson et al. (2000) estudaram a viabilidade de culturas probióticas em amostras de sorvete de iogurte, e concluíram que este produto provou ser um excelente veículo à incorporação de bactérias probióticas. A estocagem do produto teve pouco ou nenhum efeito negativo na viabilidade deste tipo de bactérias, as

quais permaneceram em níveis suficientes para atender aos efeitos terapêuticos de saúde esperados.

Frighetto (2012) estudou a viabilidade de *L. paracasei* em sorvetes simbióticos adicionados com inulina e polidextrose, e verificou que o armazenamento de 90 dias à -18 °C do produto não teve nenhum efeito negativo na viabilidade desta bactéria, sem decréscimo na população, mantendo a contagem de 8 log UFC g⁻¹.

Miguel (2009) estudou a viabilidade de *L. acidophilus* em sorvetes simbióticos adicionados com extrato de yacon, que contém inulina, e observou 2,2 x10⁹ UFC mL⁻¹ em 1 dia de armazenamento e 8,2 x 10⁸ mL⁻¹ em 180 dias de armazenamento.

Segundo Miguel, Rossi e Valdez (2004) determinaram a contagem de células viáveis de diversos cultivos microbianos em amostras de sorvete de “iogurte” à base de extrato hidrossolúvel de soja e de leite de vaca, observando que, para este tipo de sorvete de iogurte, é importante que a contagem inicial do cultivo probiótico seja de, no mínimo, 10⁸ UFC/mL, uma vez que os produtos avaliados apresentaram uma redução de 2 ciclos logarítmicos ao longo de 180 dias de armazenamento, em temperatura de -23°C.

Alamprese et al. (2005) verificaram a influência de *L. rhamnosus* GG em sorvetes com diferentes formulações, variando a quantidade de gordura e açúcar e observaram elevadas taxas de sobrevivências dos probióticos durante o armazenamento dos produtos por 365 dias, sem decréscimo na população inicialmente inoculada (8 log UFC g⁻¹).

Ertekin e Guzel-Seydim (2010) estudaram *Kefir* integral e *Kefir* desnatado sem e com 2 % de inulina e encontraram contagens de *Lactobacillus spp* entre 9,1 a 9,4 log UFC mL⁻¹ no primeiro dia e 9,7 a 9,9 log UFC mL⁻¹ no sétimo dia de armazenamento.

Com estes resultados apresentados nas contagens de BAL e pesquisas realizadas por autores citados acima, fica evidente o fato de que a estabilidade da sobrevivência de bactérias lácticas em sorvete de iogurte sofre variações, sendo que em alguns estudos relata-se a redução na contagem dessas bactérias ao passo que em outros a população destas se mantém estável. A maior ou menor resistência ao congelamento e armazenamento é uma característica própria do microrganismo, que varia com o gênero e espécie do mesmo, porém depende da matriz e das condições de processo (MIGUEL; ROSSI, 2003; PINTO et

al., 2000). Por outro lado, diversos estudos mostram que mesmo em baixas temperaturas, pode-se assegurar uma boa taxa de sobrevivência, mas que a mortalidade aumenta com o tempo de armazenamento dos produtos (THUNELL et al., 1984; FOSCHINO; BERETTA; OTTOGALLI et al., 1992).

5.7 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *LACTOBACILLUS*

Neste estudo, após a PCR, foram visualizados em gel agarose bandas de amplificação em 7 das 12 colônias isoladas em M17 e nistatina, sendo consideradas colônias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. De acordo com a Figura 8, apenas as culturas 1, 6, 10, 11 e 12 não apresentaram as bandas de amplificação, sendo resultado negativo para *Lactobacillus*.

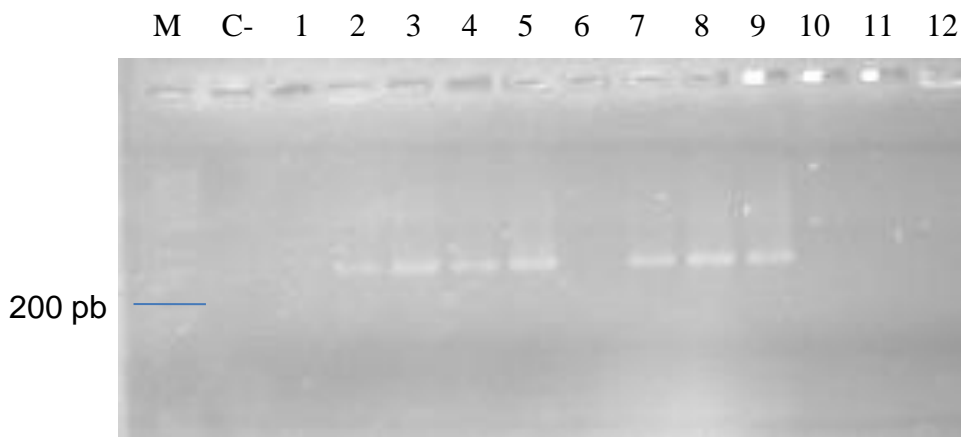


Figura 8 – Gel representativo de PCR para gênero *Lactobacillus* sp (247 pb); M: marcador de peso molecular (1 Kb DNA plus); C-: controle negativo; isolados testados aleatoriamente. Canaletas 1 a 3: SWI; Canaletas 4 a 6: SWP; Canaletas 7 a 9: SWM; Canaletas 10 a 12: SP

As amostras 2, 3, 5, 7, 8 e 9, apresentaram similaridade com *Lactobacillus kefir*, com os seus respectivos números de acesso: NCBI KF149453, NCBI KT368994, NCBI KF149170, NCBI KT368994, NCBI KF149170, NCBI KF149170. As similaridades entre as sequências foram superiores a 87% (com máximo a 98%). De acordo com os resultados, pelo menos um microrganismo em cada triplicata, foi identificado como *L. kefir* e está presente em todas as amostras, exceto o SP. Na amostra 4 não foi possível detectar o sequenciamento, pode ser devido a sobreposição de mais de um microrganismo ou por contaminação.

Lactobacillus kefir é um lactobacilo heterofermentativo, isolado de *Kefir* e descoberto em 1983. Este isolado apresenta fermentação para L-arabinose e gluconato e verificou-se ser semelhante à espécie *Lactobacillus 'desidiosus'* (MARSHALL et al., 1984). Estudos de homologia de DNA mostraram que o *L. kefir* possui 85-109% de homologia com *Lactobacillus 'caucasicus'*. Hoje em dia, ambas as espécies são consideradas como *L. kefir* (MARSHALL et al., 1984).

L. kefir é uma das espécies probióticas emergentes encontrado em *Kefir* de leite (KANDLER; KUNATH, 1983). Embora muitos estudos têm sido publicados sobre a taxonomia microbiana (Hamet et al, 2013; Hsieh, 2012) de grãos de *Kefir*, poucos estudos têm investigado o potencial probiótico de espécies individuais, como *L. kefir* (POT; TSAKALIDOU, 2009).

Nos últimos anos, houve um crescente interesse nos efeitos potenciais benéficos dos probióticos, incentivando descobertas e desenvolvimento de novas linhagens probióticas, incluindo *L. kefir*. Recentemente, os autores relatam diversos efeitos benéficos de *L. kefir*, incluindo a adesão ao muco gastrointestinal, atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar, neutralização de toxinas, a inibição de adesão de agentes patogênicos, como *Salmonella enteritidis* no epitélio intestinal, prevenção de hipercolesterolemia, a modulação da resposta imunitária, produção de exopolissacarídeos, (CARASI et al., 2012; CARASI et al., 2014ab, CARASI et al., 2015; GOLOWCZYC et al, 2007; ZHENG et al, 2013). Devido aos efeitos benéficos à saúde reportados em relação a *L. kefir*, métodos para a detecção fácil e rápida desta bactéria são necessários.

Carasi et al. (2014b) relataram que todas as 6 cepas de *L. kefir* apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, e metade das cepas foi eficaz contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*.

Segundo Likotrafiti et al. (2015) *L. kefir* tem potencial como um probiótico, pois possui propriedades associadas a bactérias probióticas, uma vez que é totalmente resistente à bile a 0,4% (m / v) e mostra atividade anti-patogênica, embora esta última propriedade com substrato específico. Apresentou resistência moderada aos ácidos, mas a resistência ao ácido pode ser aumentada através da utilização de tecnologia de encapsulamento ou formulação cuidadosa do veículo alimentar. Crescem bem em uma gama de meios suplementados com compostos

prebióticos (galacto-oligosacarídeos - GOS e lactulose) e foi observada a inativação significativa de *Listeria monocytogenes* quando GOS foi adicionado ao meio de cocultura. *L. kefir* mostra potencial como um probiótico, que é um primeiro passo para o desenvolvimento de um produto funcional e seria mais eficaz em combinação com substâncias prebióticas e, portanto, em simbióticos. Os autores Zheng et al. (2013) também verificaram que o *L. kefir* possui resistência a sais de ácidos biliares.

Wei, Chen e Chen (2015) relataram que *L. kefiranofaciens* e *L. kefir* preveniram o aparecimento de diabetes do tipo 1, estimulando a produção de peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1), inibindo pró-inflamatórios e citocinas inflamatórias, elevando a produção de Interleucina 10 (IL-10), regulando a reação imunitária-moduladora e modificando a microbiota intestinal. Estas linhagens produzem ácidos graxos de cadeia curta para mediar diretamente as habilidades estimulantes de GLP-1. Os autores sugerem que a administração oral de *L. kefiranofaciens* e *Lb. Kefiri* poderia ser benéfica para a homeostase da glicose no sangue em diabetes do tipo 1.

Ghoneum e Gimzewski (2014), demonstraram o efeito apoptótico de uma mistura composta por *Lactobacillus kefir* em células de leucemia mielóide (HL-60/AR) multirresistente (MDR) humana in vitro. Os resultados indicam que *L. kefir* P-SE representam uma nova cultura que exerce um efeito apoptótico em células de leucemia mielóide por um mecanismo que pode envolver a formação de poros ou orifícios na membrana celular das células cancerosas, e sugerem que a mistura composta por *Lactobacillus kefir* pode atuar como uma terapia potencial para o tratamento de leucemia multirresistente em humanos.

Um dos lactobacilos mais importantes recuperados a partir do *Kefir* é *Lactobacillus kefir*, estando presente em grande quantidade em seus respectivos estudos (CHEN, WANG; CHEN, 2008; MIGUEL et al, 2010; MAGALHÃES et al., 2011; KESMEN; KACMAZ, 2011). Alguns estudos demonstraram que os produtos de secreção e proteínas de superfície de *L. kefir* exercem uma ação protetora contra a invasão de *Salmonella entérica serovar Enteritidis* em células Caco-2 (GOLOWCZYC et al, 2007) e também contra os efeitos citotóxicos de toxinas de *Clostridium difficile* em células Vero (CARASI et al, 2012). Além disso, para algumas linhagens de *L. kefir* têm sido provados que são seguras (CARASI et al, 2014b) e podem aderir ao muco gastrointestinal (CARASI et al, 2014a). Por outro lado, linhagens de *L. kefir* preservam uma elevada percentagem de viabilidade depois

que ambos processos de secagem por pulverização (GOLOWCZYC et al, 2010; GOLOWCZYC et al, 2011) e liofilização foram conduzidos (BOLLA et al, 2011). Todos as propriedades citadas mostram a potencialidade de *L. kefir* como microrganismo probiótico.

Chen et al. (2008) descreveram que o *L. kefir* foi a espécie com maior frequência identificada em grãos de *Kefir* de leite de Taiwan, seguido pela espécie *L. kefiranofaciens*, e com menor frequência foram identificados *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactococcus lactis*.

Miguel et al. (2009) apresentaram as bactérias ácido-láticas, especificamente o gênero *Lactobacillus* como predominante nos grãos de *Kefir*, onde as espécies identificadas foram: *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus satsumensis*. O gênero *Lactobacillus* esteve presente em todos as amostras dos grãos, indicando a importância deste grupo para a elaboração de bebidas. O *Lactobacillus kefir* foi a bactéria predominante em 7 de 11 amostras dos grãos de *Kefir*.

O potencial probiótico das espécies isoladas por Zanirati (2012) pode ser inferido comparando as características e funções descritas na literatura para algumas das espécies isoladas dos grãos de *Kefir*. Segundo Zanirati (2012), o gênero *Lactobacillus* está presente em 7 de 8 amostras de grãos de *Kefir*, indicando a importância deste gênero bacteriano para a produção da bebida de *Kefir*. O *L. kefir* apresenta a presença de proteínas de superfície (proteína camada S) que podem desempenhar um papel na adesão a células intestinais (Garrote et al., 2004). Castagliuolo et al. (2005) evidenciaram o efeito protetor de *L. crispatus* durante a inflamação intestinal, por indução de colite em camundongos, pela atividade de coagregação desta espécie. Kekkonen et al. (2008) demonstraram, em estudo *in vitro*, que *Leuconostoc mesenteroides* é indutora das citocinas da resposta imune tipo Th1. Bravo et al. (2009) demonstraram a habilidade de *Lactococcus lactis* de inibirem patógenos pela produção de bacteriocinas. O *L. casei* tem potencial probiótico como mostrado por Sabir et al. (2010) em testes *in vitro* como a produção de peróxido de hidrogênio, produção de ácido láctico, resistência a sais biliares e suco gástrico, quantificação e produção de exopolissacarídeos (EPS) e resistência a antibióticos.

Apesar do *Kefir* ser considerado probiótico e apresentar efeitos benéficos à saúde, a microbiota do *Kefir* é muito variável, dependendo da matriz na

qual esta inserido ou foi utilizada, como por exemplo leite, água com açúcar mascavo ou suco de frutas, e também em função da utilização de substâncias prebióticas (neste estudo foram utilizados inulina, e fibra alimentar polidextrose), e nada garante que as fermentações apresentarão sempre os mesmos microrganismos. (GUZEL-SEYDIM et al., 2011; MICHELLI et al. 1999; COSTA; ROSA, 2010)

Pode-se observar que em muitos estudos aparece o gênero *Lactobacillus* como predominante na maioria das amostras de *Kefir*, indicando que grãos de várias origens e regiões possuem *Lactobacillus spp*, garantindo que as bebidas e produtos fermentados por eles, promovam benefícios de saúde para os humanos caso as espécies sejam probióticas. Porém, segundo consenso de peritos internacionais Hill et al. (2014) produtos dessa natureza, com microbiota complexa e mista devem ser denominados como contendo microrganismos vivos.

Infelizmente, apesar de neste estudo terem sido obtidos resultados evidentes para a identificação da espécie *Lactobacillus kefir* nos sorvetes desenvolvidos, não podemos afirmar que somente esta espécie esteja presente nas contagens de 10^8 UFC/g, poderiam também estar em menor quantidade outras espécies de *Lactobacillus* e *Lactococcus* provenientes da fermentação dos grãos de *Kefir* na calda.

Os sorvetes fermentados com essa cultura artesanal de *Kefir*, tem alto potencial de serem considerados como alimentos probióticos e funcionais, devido aos inúmeros benefícios à saúde que o produto per si com alto teor de proteína e fibras incluindo *Lactobacillus kefir* poderia proporcionar, já que em muitos estudos com grãos de *Kefir* esses lactobacilos estão presentes. A adição de fibras também pode alterar a microbiota do *Kefir*, tornando-o mais saudável para o hospedeiro pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade de bactérias no cólon.

5.8 CONTAGEM NO MEIO SELETIVO DIFERENCIAL MRS-MALTOSE

As contagens em meio seletivo para *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei*, e em meio seletivo (MRS-clindamicina) para *Lactobacillus acidophilus* estão apresentadas na Tabela 10.

As linhagens de *L. kefir* isoladas dos sorvetes (presente nas amostras SWI, SWP e SWM) foram inoculadas em caldo MRS-maltose sob anaerobiose durante 72 h para verificar com esse teste se havia crescimento destes em caldo MRS-maltose, e o resultado foi (dados não mostrados) que *L. kefir* também cresce neste meio. Foi realizado teste também com MRS-clindamicina, mas não houve crescimento de *L. kefir*. Segundo Carasi et al. (2014b), as cepas de *L. kefir* são susceptíveis a antibiótico clindamicina.

Tabela 10 – Contagem em MRS-maltose e MRS-clindamicina nas diferentes formulações de sorvetes funcionais ao longo de 90 dias de estocagem a -18°C

Meios	Tempo (Dias)	Formulações				
		SWI	SWP	SWM	SP	Média
MRS- Maltose	1	8,80 ± 0,03 ^{abA}	8,77 ± 0,02 ^{aA}	8,75 ± 0,02 ^{aA}	8,69 ± 0,03 ^{aB}	8,75
	30	8,81 ± 0,01 ^{aA}	8,76 ± 0,01 ^{aAB}	8,73 ± 0,01 ^{aBC}	8,71 ± 0,03 ^{aC}	8,75
	60	8,77 ± 0,02 ^{ba}	8,75 ± 0,05 ^{aA}	8,73 ± 0,04 ^{aA}	8,43 ± 0,04 ^{ba}	8,67
	90	8,77 ± 0,00 ^{ba}	8,76 ± 0,01 ^{aA}	8,74 ± 0,11 ^{aA}	8,31 ± 0,04 ^{cb}	8,64
Média		8,79	8,76	8,74	8,53	
MRS- clindami- cina	1	8,93 ± 0,02 ^{aA}	8,92 ± 0,02 ^{aA}	8,88 ± 0,02 ^{aAB}	8,77 ± 0,10 ^{aB}	8,87
	30	8,92 ± 0,02 ^{aA}	8,90 ± 0,04 ^{aA}	8,87 ± 0,03 ^{aA}	8,75 ± 0,05 ^{aB}	8,86
	60	8,82 ± 0,04 ^{abA}	8,83 ± 0,03 ^{abA}	8,61 ± 0,13 ^{ba}	8,35 ± 0,03 ^{bc}	8,65
	90	8,74 ± 0,11 ^{ba}	8,76 ± 0,05 ^{ba}	8,57 ± 0,09 ^{ba}	7,47 ± 0,27 ^{cb}	8,38
Média		8,85	8,87	8,74	8,34	

*Resultados expressos em log UFC g⁻¹. Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras minúsculas iguais, na coluna, não diferem a $p \leq 0,05$. Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras maiúsculas iguais, na linha, para cada formulação, não diferem a $p \leq 0,05$. Ágar MRS-maltose suplementado com nistatina, incubado a 37 °C sob anaerobiose por 72 h. Ágar MRS-clindamicina suplementado com nistatina, incubado a 37 °C sob anaerobiose por 72 h. SP = Sorvete Padrão; SWI = Sorvete com Inulina; SWP = Sorvete com Polidextrose; SWM = Sorvete com Maltodextrina

Neste estudo, a contagem diferencial para *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei* apontou presença de colônias na ordem logarítmica de 8 ciclos nas formulações dos sorvetes e manutenção dos números após o congelamento. A contagem em MRS-clindamicina também teve o mesmo comportamento, exceto para amostra SP, onde houve diminuição significativa na ordem logarítmica de 1 ciclo após 90 dias de armazenamento. Provavelmente, o congelamento deve ter causado danos a células viáveis, enquanto que amostras

adicionadas de substâncias prebióticas e fibra alimentar mantiveram a viabilidade devido às propriedades crioprotetoras (AKALIN; ERISIR, 2008). Entretanto conforme discutido não é possível afirmar que todos os microrganismos pertençam à essas espécies já que os grãos de *Kefir* contém uma microbiota rica, complexa e variada de microrganismos.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 10, é possível observar ao longo de 90 dias de armazenamento que as formulações com inulina (SWI), polidextrose (SWP) e maltodextrina (SWM) não apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) na contagem das células viáveis das espécies de *Lactobacillus spp.* Porém houve diferença significativa na formulação do sorvete padrão (SP), onde ocorreu uma redução da ordem de ciclo logarítmico ao longo do período após 60 dias de estocagem, na contagem de células viáveis. No meio MRS-clindamicina, teve diminuição significativa ($p < 0,05$) após 90 dias de estocagem para amostras SWI e SWP, diminuição após 60 dias para amostras SP e SWM. Entretanto apesar dessa redução a contagem ainda esteve na ordem de 10^8 UFC/g, preservando, assim, a condição para ser considerado um produto com potencial probiótico, sem afetar as propriedades funcionais que o produto proporciona (KIM, 1998; MATTILA – SANDHOLM et al., 2002).

O agar MRS-maltose foi desenvolvido para contar seletivamente *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei*, entretanto nesse caso cresceram também *L. kefir*. O que ocorre nesses casos, como já apontado por Van de Castele et al. (2006), a escolha do meio de cultura e a seletividade para cepas probióticas em combinação com culturas starters depende fortemente da matriz do alimento e da microbiota de acompanhamento, o grupo alvo e a diversidade taxonômica da microbiota no produto. Portanto não é possível saber efetivamente quais bactérias lácticas cresceram sob essas condições.

Para Van de Castele et al. (2006), na prática, a enumeração diferencial de bactérias probióticas em conjunto com cultura starter é muitas vezes difícil de alcançar devido à presença de múltiplas espécies de BAL intimamente relacionadas em produtos como iogurtes e queijos fermentados, e neste caso grãos de *Kefir*, uma microbiota muito mais complexa. Vários meios de cultura foram desenvolvidos e avaliados para a enumeração seletiva de BAL probióticas em iogurtes e leite fermentados (CAMASCHELLA et al., 1998; DAVE; SHAH, 1996;

NEBRA; BLANCH, 1999; ONGGO; FLEET, 1993; ROY, 2001; TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004; VINDEROLA; REINHEIMER, 1999).

Süle et al. (2014) utilizou agar MRS-CC (Clindamicina-Ciprofloxacina) e mostrou relativamente boa seletividade para *L. acidophilus*, no entanto, também suportou o crescimento cepas de *L. casei*. Por esta razão, o agar MRS-CC só pode ser usado como um meio seletivo para a enumeração de *L. acidophilus* se o *L. casei* não estiver presente em um produto em níveis comparáveis ou superiores a *L. acidophilus*. Para Saccharo et al. (2012) ocorreu a enumeração de *L. acidophilus* na presença do *L. rhamnosus* em agar MRS-clindamicina, onde esta observação foi surpresa para os autores. Estes resultados são de certa forma surpreendentes, pois agar o MRS-clindamicina é considerado meio ideal para a contagem seletiva de *L. acidophilus* cultivados em co-cultura com culturas starters ou outras cepas probióticas comerciais (VAN DE CASTEELE et al., 2006). É bem conhecido, no entanto, que *L. acidophilus* é bastante difícil enumerar seletivamente em populações mistas, pois a maioria dos meios de apoio ao crescimento de *L. acidophilus* também promovem crescimento de *L. rhamnosus* e *L. casei* (LIMA et al. , 2009; THARMARAJ; SHAH, 2003).

Nos meios seletivos MRS-maltose e MRS-clindamicina há a possibilidade (embora sem quantificação de percentuais) de que estejam presentes *L. casei* e *L. acidophilus* que são consideradas linhagens probióticas. Neste caso, seria necessário a continuação deste trabalho dando ênfase à identificação dos gêneros e espécies de bactérias ácido-lácticas e probióticas do *Kefir*. Entretanto as formulações desenvolvidas e os métodos de contagem empregados permitiram em uma matriz láctea com alto teor de proteína e polissacarídeos ou não (caso da formulação padrão) a predominância de *L. kefir*.

5.9 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial indicou boa aceitação para todas as formulações de sorvete desenvolvidas, com notas entre 6,0 e 8,0, em escala hedônica de 9 pontos, para todos os atributos (Tabela 11). Na comparação geral entre as amostras, o sorvete SP e SWI apresentaram as maiores aprovações, ocorrendo diferença significativa ($p \leq 0,05$) apenas no atributo sabor, porém a redução não chegou a

representar um aspecto negativo, uma vez não houve diferença entre as duas formulações, SP e SWI, quanto a aceitação global, com notas de 8,1 e 7,6 respectivamente.

Tabela 11 – Média das notas atribuídas aos sorvetes pelos provadores

Atributos	SP	SWI	SWP	SWM
Aparência	8,0 ^a	7,9 ^{ab}	7,8 ^{ab}	7,5 ^b
Aroma	7,1 ^a	7,5 ^a	7,0 ^{ab}	6,3 ^b
Cor	7,8 ^a	7,9 ^a	7,8 ^a	7,7 ^a
Sabor	7,9 ^a	7,1 ^b	6,9 ^b	5,9 ^c
Textura	8,1 ^a	7,6 ^{ab}	7,6 ^{ab}	7,0 ^b
Global	8,1 ^a	7,6 ^{ab}	7,3 ^b	6,4 ^c

* Médias acompanhadas de letras minúsculas iguais, na linha, não diferem a $p \leq 0,05$. SP = Sorvete Padrão Integral; SWI = Sorvete com Inulina; SWP = Sorvete com Polidextrose; SWM = Sorvete com Maltodextrina

O sorvete com polidextrose (SWP) obteve notas inferiores ao padrão (SP), somente nos atributos sabor e aceitação global, mas não diferenciou-se do SWI em todos os atributos. O sorvete contendo maltodextrina (SWM) mostrou menor aceitação que o padrão (SP), exceto na cor; e de forma geral, também foi menos aceito que SWP e SWI, porém ainda assim apresentou pontuação superior a 6 em todos atributos, demonstrando aprovação pelos julgadores. O sorvete SWM pode ter sido menos aceito, devido a maltodextrina ter maior ação espessante no sorvete do que emulsificante, necessitando utilização de outros ingredientes complementares para uma melhor aceitação do sorvete.

Em geral, os sorvetes desenvolvidos apresentaram resultados de que a textura, cor e aparência foram bem aceitos pelos provadores, indicando que os ingredientes alimentares utilizados (isolado protéico de soro, inulina, polidextrose e maltodextrina) podem servir para substituir a gordura, atuando como agentes espessantes e contribuindo para boa aparência do produto final, devido às suas propriedades funcionais tecnológicas.

Apesar da baixa concentração de lipídeos presente nas amostras SWI, SWP e SWM representar um fator benéfico à saúde, Ordóñez et al. (2000) destacaram que a gordura do leite empregada no processamento de sorvetes, melhora consideravelmente os atributos sensoriais do sorvete, contribui para um sabor mais agradável, apresenta ótimo poder de sinergia para componentes flavorizantes adicionados a estes produtos, além de proporcionar também melhorias na qualidade da textura.

6. CONCLUSÃO

Os produtos desenvolvidos, 3 formulações de sorvetes funcionais, atenderam aos padrões para análises microbiológicas, análise sensorial, e foram bem aceitos por potenciais consumidores do produto.

O produto fermentado e formulado apresentou quantidade mínima necessária de microrganismos benéficos (UFC/g) segundo padrões internacionais para que os produtos lácteos sejam considerados como potenciais probióticos e contendo microrganismos vivos.

As propriedades funcionais do soro protéico, da inulina, da polidextrose, da maltodextrina com celulose microcristalina melhoraram as características nutricionais, e também substituíram parcial ou totalmente outros ingredientes, como gordura, açúcares, resultando em um produto com potencial probiótico, funcional, com teor de gordura inferior a 0,5 % (diet), baixo teor de açúcares, baixo teor de lactose e baixas calorias.

REFERÊNCIAS

- ABIS (2008). Produção Mundial de Sorvete. Disponível em: <http://www.abis.com.br/estat.asp>. Acesso em: 10 de jun. de 2013.
- ABIS (2010). Associação Brasileira da Indústria de Sorvete. Disponível em: <www.abis.com.br>. Acesso em: 1º fev de 2013.
- ABIS (2012). Produção Mundial de Sorvete. Disponível em: http://www.abis.com.br/estatistica_producaoconsumodesorvetesnobrasil.html. Acesso em: 26 de jul. de 2013.
- AGRAWAL, R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. **Food Biotechnology**, v.19, p.227-46, 2005.
- AIRES, A. G. O. **Soro de Leite como Suplemento Proteico para Atletas**. 2010. 52 f. Monografia para o Curso de Engenharia de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- AKALIN, A. S. et al. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced probiotic yogurt during storage.. **Journal of Food Science**, v. 72 p. 222-227, 2007
- AKALIN, A.S.; ERISIR, D. Effects of inulin and oligofrutose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. **Journal of Food Sci.**, v.73, n.4, p.184-188, 2008.
- ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; CORTI, S. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. **Int. J. Dairy Technol.**, v.58, p.200-206, 2005.
- ALAMPRESE, C. et al. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **Int. Dairy J.**, v.12, p.201-208, 2002.
- AMIOT, J. **Ciência y tecnologia de la leche**. Zagaroza: Acrbia, 1991, 547 p
- ANAL, A.K. SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**. v.18, Issue 5, p. 240–251. 2007,
- ANFITEATRO, D.N. **A probiotic gem cultured with a probiotic jewel**. Disponível em: < <http://users.chariot.net.au/~dna/Kefirpage.html>>. Acesso em: 09 jul. 2013.
- ANTUNES, J. S. **Proteínas do leite**. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. Barueri, SP: Manole, 2003
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Bacteriological Analytical Manual. 8th edition. **AOAC International**. Arlington, VA, USA, 1995a.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis of **AOAC INTERNATIONAL. METHOD 991.14**. 18th Edition, 2005.

AOAC (Association Official Analytical Chemistry). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17 th ed. Arlington: AOAC., 1995b. 1141 p.

APORTELA-PALACIOS, A.; SOSA-MORALES, M. E.; VÉLEZ-RUIZ, J. F. Rheological and physicochemical behavior of fortified yogurt, with fiber and calcium. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v. 36, n. 3, p. 333- 349, 2005.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Ed.Blücher, 2001. v. 4, 523 p.

ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de Lactobacillus Delbrueckii UFV H2b20 e de Inulina**. 2007. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Viçosa, MG, 2007.

ARAÚJO, J. M. A. **Química dos Alimentos** - teoria e prática. 2 ed. Viçosa : Ed. Universidade Federal de Viçosa, 2001. 416p.

AUDY, J. et al. Transcriptomic response of immune signalling pathways in intestinal epithelial cells exposed to lipopolysaccharides, Gram-negative bacteria or potentially probiotic microbes. **Beneficial Microbes**, December 2012; 3(4): 273-286

ARTZ, W.E.; HANSEN, S.L. Other fat substitutes. In: AKOH, C.C.; SWANSON, B.G. **Carbohydrate polyesters as fat substitutes**. New York, Marcel Dekker, 1994. p. 197-236.

AXELSSON, L. T. **Lactic acid bacteria: classification and physiology**. In S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), Lactic acid bacteria (p.1-64). New York, USA: Marcel Dekker. 1993

BARROS, M.R., ANDREATTI R.L.F, OLIVEIRA, D.E., LIMA, E.T, CROCCI, A.J. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de Lactobacillus spp., isolados de aves. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.2, p.319-325, 2009

BOARD, R.G. **Introducción a la Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1988, 272p

BOLLA, P. A. et al. "Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir," **Journal of DairyResearch**, vol. 78, no. 1, p. 15–22, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.46, 23 de Outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial**, Brasília, 24 Out 2007a, seção 1, p. 5.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Gelados Comestíveis, Preparados, Pós para o Preparo e Bases para Gelados Comestíveis. **Consulta Pública nº 28**, Brasília, 01 de jun. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional.. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 dez. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. **Atualizado em julho de 2008**. IX - Lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas. Disponível em;< http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em 05 mai. 2014, 2008

BRASIL. Ministério da Saúde. Alegações de propriedade funcional e de saúde. **Atualizado em março de 2016**. Disponível em;<<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/wwr>>. Acesso em 02 mai. 2016, 2016.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada n. 266, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 set. 2005.

BRAVO D.; RODRIGUEZ E.; MEDINA M. Nisin and lacticin 481 coproduction by *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk. **Journal of Dairy Science**. v.92, p. 4805–481, 2009

BUDDINGTON, R. Using probiotics and prebiotics to manage the gastrointestinal tract ecosystem. In: CHARALAMPOPOULOS, D. & RASTALL, R. A. (Org.). **Prebiotics and probiotics science and technology**. v.1. New York: Springer, 2009. cap. 1, p.1-32.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p.121-129, 2010.

CAMASCHELLA, P. et al. Method for differentiated enumeration of mixed cultures of thermophilic lactic acid bacteria and bifidobacteria by using only one culture medium. **Le Lait**, v. 78, n.4, p. 461–467, 1998

CÂNDIDO, L.M.B.; CAMPOS, A.M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. São Paulo: Varela, 1996.

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. Regul. **Toxicol. Pharmacol.**, New York, v.30, p.268-282, 1999.

CARASI, P. et al. Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. **Journal of Dairy Research**; v.81, n.1, p.16–23, 2014a.

- CARASI, P. et al. Impact of Kefir Derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota. **J. Immunol. Res.** 361604. doi: 10.1155/2015/361604, 2015
- CARASI, P. et al. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. **BioMed Research International**; 7p. 2014b,
- CARASI, P. et al. Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize in vitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. **Anaerobe**, vol. 18, no. 1, pp. 135–142, 2012.
- CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic petit-suisse cheese. **LWT- Food Science and Technology**, v.41, n.6, p.1037-1046, 2008.
- CASTAGLIUOLO, I.; Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 43, n. 2, p.197-204, 2005.
- CASTILHO, C.M.C. Sorvete: a delícia que alimenta. **Leite & Derivados**, v.1, n.6, p42-43, 1992.
- CHEN, H. C.; WANG, S. Y. & CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, v. 25, p. 492–501, 2008.
- CHEN, T.-H.; WANG, S.-Y.; CHEN, K.-N.; LIU, J.-R.; CHEN, M.-J. Microbiological and chemical properties of *Kefir* manufactured by entrapped microorganisms isolated from *Kefir* grains. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3002-3013, 2009.
- CHRISTIANSEN, P. S., EDELSTEN, D., KRISTIANSEN, J. R., & NIELSEN, E. W. Some properties of ice cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. **Milchwissenschaft**, v. 51, p. 502-504, 1996.
- CHRONAKIS, I.S. On the molecular characteristics, composition properties, and structural – functional mechanisms of maltodextrins: a review. **Critical Reviews in Food Science**, v.38, n.7, p.599-637, 1998
- CLEMENTI, F.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J. Carbon dioxide synthesis by immobilized yeast cells in *Kefir* production. **Milchwissenschaft** , v. 44, p. 70-74, 1989.
- COELHO, D. T.; ROCHA, J. A. A. **Práticas do processamento de produtos de origem animal**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005.
- COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. de. **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.560 p.

COUSSEMET, P.; FRANCK, A. New food applications for inulin. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 9, n. 3, p. 26-28, 1998.

CRAIG, S. A. S. et al. Polydextrose as Soluble fiber: Physiological and Analytical Aspects. **American Association of Cereal Chemists**. v. 43, n. 05, 1998.

CRUZ, A. G.; ANTUNES, A. E. C.; ARAMI, J. B.; SOUSA, A. L. O. P.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Sorvetes probióticos e prebióticos. In: SAAD, S. M. I.; In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2011. cap 15, p. 359-388.

CRUZ, A. G.; ANTUNES, A. E. C.; SOUSA, A. L. O. P.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, p. 1233-1239, 2009.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2011. cap 15, p. 359-388.

CZAMANSKI, R.T. **Avaliação da atividade antibacteriana de filtrados de quefir Artesanal**. 2003. 120 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1529–1536, 1996

DAVIDSON, R.H., et al. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **J. Dairy Sci.**, v.83, n.4, p.666-673, 2000.

De VRESE, M. et al. (1992). Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial beta-galactosidase of *Kefir*. **British Journal of Nutrition**, 67, p. 67-75.

DELIZA, Rosires. et al. Produto de “leite” de soja enriquecido com cálcio. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n. 1, jan-mar, 2005. p. 86-91.

DEVEREUX, H. M.; JONES, G. P.; MCCORMACK, L.; HUNTER, W. C. Consumer acceptability of low fat foods containing inulin and oligofructose. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 1850-1854, 2003.

DOUGLAS, L.C.; SANDERS, M,E. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. **J. Am.Diet. Assoc.** v.108, n. 3, p.510-521, 2008.

DUTRA de OLIVEIRA, J.E.; SANTOS, A.C.; WILSON, E.D. **Nutrição básica**. São Paulo: Sarvier, 1982. 286p.

ERTEKIN, B.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. Effect of fat replacer on *Kefir* quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 90, p. 543-548, 2009.

ESPINOZA, Y. R.; NAVARRO, Y. G. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1-11, 2010.

FAO/WHO. Experts' Report (2001). **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.**

FAO / WHO. **MILK AND MILK PRODUCTS SECOND EDITION: CODEX STANDARD FOR FERMENTED MILKS CODEX STAN 243-2003.** Roma, 2011.
Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/015/i2085e/i2085e00.pdf>>. Acesso em: 08 mai. 2016

FARNWORTH, E.D.; MAINVILLE, A. *Kefir-A Fermented milk product.* **Handbook of Fermented Functional Foods Functional Foods and Nutraceuticals Series.** 2 ed., n. 4, p. 89-128, 2008.

FARNWORTH, E.R. **Handbook of fermented functional foods.** CRC Press. 2003
FARNWORTH, E.R. *Kefir- a complex probiotic.* **Food Science and Technology Bulletin**, v. 2, 2005, p1-17.

FERREIRA, C. L. L. F. Benefícios das culturas lácticas probióticas. In: OLIVEIRA, M. N.(Org.). **Tecnologia de produtos lácteos funcionais.** São Paulo: Atheneu Editora, 2009, p. 213-234.

FLACK, E. The role of emulsifiers in low-fat food products. In: ROLLER, S.; JONES, S. A. (Ed) **Handbook of Fat Replacers.** Boca Raton: CRC Press, p 213-234, 1996.

FLOWERS, K. S. et al. Salmonella. In: APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 3.ed. Washington, 1992. p. 371-422.

FLOWERS, R.S., ANDREWS, W. DONELLY, C.W., KOENIG, E. 1993. Pathogens in milk and milk products. In: R.T. Marshall (ed.). **Standard methods for the examination of dairy products**, 16th ed. American Public Health Association, Washington DC, USA. p. 103-212.

FOSCHINO, R.; BERETTA, C.; OTTOGALLI, G. Studio delle condizioni ottimali di congelamento e scongelamento di colture lattiche termofile. **L'industria del Latte**, v. 28, p.49-67, 1992.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. p. 287-291, 2002.

FRIGHETTO, J. M. **Produção de sorvetes com características simbióticas e avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* em condições gastrointestinais simuladas.** 2012, 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos - Universidade Federal Santa Maria, Santa Maria, 2012.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378. 1989

GARCIA FONTAN, M.; MARTÍNEZ, S.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. **International Dairy Journal**, v.16, p.762–767, 2006.

GARCIA, S.; SOUZA, G.; VALLE, J.L. E. Quefir e sua tecnologia - aspectos gerais. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 137-155, 1984.

GARROTE, G. L. et al. L. Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S layer proteins. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 222–230, 2004.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Characteristics of *Kefir* prepared with different grain: milk ratios. **Journal of Dairy Research**, v. 65, p. 149-154, 1998.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of *Kefir* grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 639-652, 2001.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. *Inhibitory power of Kefir: the role of organic acids*. **J Food Prot.** v. 63. n. 3. p. 364-369, 2000

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. Preservation of *Kefir*, a comparative study. **LWT- Food Science and Technology**, v.30, p.77-84, 1997.

GHONEUM, M, GIMZEWSKI, J. Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrug-resistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism. **Int J Oncol.** v. 44, p.830–837, 2014.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal Nutrition.** v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R; GLENN, R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clin Nutr Suppl**, v. 1, p. 25–31, 2004.

GIBSON, G. R. et al. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v.108, n.4, p. 975-982, 1995.

GILLILAND, S. E. Acidophilus milk-products a review of potential benefits to consumers. **Journal of Dairy Science**, v.72, p. 2483-2495. 1989

GISMONDO, M. R., DRAGO, L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.12, p.287-292, 1999.

GOFF, H. D. 65 years of ice cream science. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 754-758, 2008.

GOLOWCZYC, M. A., J. et al. "Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties" **International Journal of Food Microbiology**, vol. 144, no. 3, p. 556–560, 2011

GOLOWCZYC, M. A., J. et al. "Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying," **Letters in Applied Microbiology**, vol. 50, no. 1, p. 7–12, 2010

GOLOWCZYC, M. A., J. et al. "Protective action of *Lactobacillus* kefir carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis," **International Journal of Food Microbiology**, vol. 118, no. 3, pp. 264–273, 2007.

GOMIDES, A. F. F. **Análise histológica e por imunofluorescência de órgãos de camundongos para detecção de *Klebsiella pneumoniae***. 2006. 58 f. Dissertação (biologia celular e estrutural) – Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/31/TDE-2006-12-14T075507Z-166/publico/texto%20completo.pdf. Acesso em: 05 jun 2015.

GORDON, D.T.; BOCALETTI, W; ORELLANA, R. Fat substitutes, fat mimetics and bulking agents. The rest of the story. **Tecnologia de Alimentos (México)**, v.30, n.5, p.22-29, 1996.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, 2010.

GUINARD, J.X. Session III: Additives, colours, flavours. In: BUCHHEIM, W. Ice Cream - Proceedings of the international symposium held in Athens. **Int. Dairy Fed.** p. 91-103, 1998.

GUZEL-SEYDIM, Z. B. et. al. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 3, 2011, p. 261-268

HAMET, M. F. et al. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirianofaciens* in microbial consortia present in kefir grains. **Food Microbiol.** 36 327–334. 2013.

HARAGUCHI, F.K., ABREU, W.C., PAULA, H de.. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev Nutr.**, Campinas, v.19, n.4. 2006. p. 479-88.

HAULY, M.C.O.; MOSCATTO, J.A. Inulina e oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. Semina: **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.23, n.1, p. 105-118, 2002.

HERTZLER, S.R.; CLANCY, S.M. *Kefir* improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, p. 582-587, 2003.

HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews | Gastroenterology & Hepatology**, 11, p. 506–514, 2014.

HSIEH, H.-H. et al. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, 2012, p. 73-81.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technol.**, Chicago, v. 50, p. 49-52, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Químicos e Físicos para análise de Alimentos**. 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **General standard of identify for fermented milks**. Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 1992.

IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F.C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of *Kefir* during storage. **Food Chemistry**, v.90, p.613–620, 2005.

JIANZHONG, Z., XIAOLI, L. B., HANHU, J., & MINGSHENG, D. Analysis of the KAILASAPATHY, K. & SULTANA, K. Survival and β -galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice cream. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 223-227, 2003.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p.80-88, 2000

KANDLER, O.; KUNATH, P. *Lactobacillus kefir* sp.nov, a component of the microflora of Kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 4, p, 286–294, 1983.

KEKKONEN, R. A. et al. Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- production. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, n. 8, p.1192-1203, 2008.

KESMEN, Z. & KACMAZ, N. Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p. 276-283, 2011.

KIM, H.S. Characterization of Lactobacilli and Bifidobacteria as Applied to Dietary Adjuncts. **Cult. Dairy Prod. J.** v. 23, n.3, p. 2-6, 1998.

KINSELLA, J.E. Milk proteins: physicochemical and functional properties. **CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.**, v.21, n.3, p.197-262, 1984

- KOROLEVA, N. S. Products prepared with lactic acid bacteria and yeast. In: ROBINSON, R.K.. (Ed), Therapeutic properties of fermented milks. London: Elsevier Applied Sciences, 1991, 179p
- KOROLEVA, N. S. Special products (*Kefir*, koumiss etc.). **Proceedings of the XXI International Dairy Congress 2**, MirKasra Publication, Moscow, p. 146-152, 1982.
- KWAK, H. S.; PARK, S. K.; KIM, D. S. Biostabilization of *Kefir* with a nonlactose-fermenting yeast. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 937-942, 1996.
- LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. 2. ed. New York: Food Science Text Series, 2010
- LEE, S. C.; PROSKY, L. Perspectives on new dietary fiber definition. **Cereal Food World**, St. Paul, v. 39, n. 10, p. 767-768, 1994.
- LIBUDZISZ, Z.; PIATKIEWICZ, A. *Kefir* production in Poland. **Dairy Industries International**, v. 55, p. 31-33, 1990.
- LIKOTRAFITI, E. et al. In vitro evaluation of potential antimicrobial synbiotics using *Lactobacillus kefir* isolated from kefir grains. **International Dairy Journal**. v. 45, 2015, p. 23-30
- LIMA, K.G.D et al. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **LWT - Food Sci Technol** v. 42, p.491-495, 2009
- LOMAX, A.R, CALDER, P.C. "Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence". **Br J Nutr**. v.101, n.5, p.633–658, 2009.
- LOMER, M.C.E.; PARKES, G.C.; SANDERSON, J.D. Lactose intolerance clinical practice – Myths and realities. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.27, n.2, p.93-103, 2008.
- LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **Am J Clin Nutr**. 2003; 77(6):1537-43.
- LORETAN, T.; MOSTERT, J. F.; VILJEON, B. C. Microbial flora associated with South African household kefir. **South African Journal of Science**, v. 99, p. 92-94, 2003.
- LOURENS-HATTINGH, A., VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2002.
- LUCCA, P.A.; TEPPER, B.J. Fat replacers and the functionality of fat in foods. **Trends in Food Science and Technology**, v.5, n.1, p.12-19, 1994.
- MAGALHÃES, K. T. et al. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.693-702, 2011.

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

MARSHALL, R. T.; ARBUCKLE, W. S. **Ice Cream**. 5ª ed. Chapman and Hall, New York, 1996.

MARSHALL, V. M A note on the heterofermentative lactobacilli isolated from kefir grains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, p. 503–505, 1984.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M. Methods for making *Kefir* and fermented milks based on *Kefir*. **Journal of Dairy Research**, v. 52, p. 451-456, 1985.

MATTES, R.D. Position of the American Dietetic Association: fat replacers. **J. Am. Dietetic Ass.**, v. 98, n. 4, p.463-468, 1998.

MATTHEWS, M. E; KENNEDY, J. F. Review: whey pollution problem and potencial. **International Journal of Food Science and Technology**, v.23, p. 323-336, 1988.

MATTILA-SANDHOLM T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **Int. Dairy J.** V.12, p.173-182, 2002.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 181-188, 2003.

MICHELLI L., UCCELLETTI D., PALLESCHI C., CRESCENZI V. Isolation and characterisation of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 53, p. 69-74, 1999.

MIGUEL, D.P; ROSSI, E. A.; VALDEZ, G. F. de. Sensory and chemical aspects of frozen soy yogurt fermented with *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus jugurti*.. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, p. 197-201, 2004.

MIGUEL, D; ROSSI, E. VIABILIDADE DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM SORVETES DE IOGURTE DURANTE O PERÍODO DE ESTOCAGEM. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.14, n.1, p. 93-96, 2003

MIGUEL, M. G. C. P. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v. 43, p. 1523–1528, 2010.

MIGUEL, M.G.C.P. **Identificação de microrganismos isolados de grãos de kefir de leite e de água de diferentes localidades**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MILLER, G. D.; JARVIS, J. K. McBEAN, L. D. **Handbook of Dairy Products and Nutrition**, 2ª ed., CRC Press LLC, Illinois, 2000.

MITCHELL, H. O uso de carboidratos especiais. **Food Ingredients**, São Paulo, n. 21, p. 42-44, 2002

- MIZUBUTI, I.Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina Ciênc. Agr.**, v. 15, p. 80-94, 1994.
- MODLER, H. W. et al. Physical and sensory properties of yogurt stabilized with milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v.66, n.3, p.422-429, 1983.
- MOLIS, C.; FLOURIÉ, B.; OUARNE, F.; GAILING, M.F.; GUIBERT, A.; BORNET, F.; GALMICHE, J.P. Digestion excretion, and energy value of fructooligosaccharides on healthy humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.64, p. 324-328, 1996.
- MONTANUCI, F. D. **Bebidas de Kefir com e sem inulina em versões integral e desnatada: elaboração e caracterização química, física, microbiológica e sensorial**. 2010.139 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CCA, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.
- NAUM, C. Whey Protein. Conselho Regional de Nutricionistas CRN-5 (5ª Região: Bahia e Sergipe) **CRN 5 Em Revista**. 2ª ed. 2010.
- NEBRA, Y; BLANCH, A.R. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.11, p. 5173–5176, 1999
- NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: EMBRAPA GADO DE LEITE. **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar**. Juiz de Fora, MG, 2001. p.97-108
- NINESS, K. R. Inulin and oligofuctose: what are they? **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7S, p. 1402s-1406s, 1999.
- NOOHI, N. et al. "Phenotypic Characteristics and Probiotic Potentials of *Lactobacillus* Spp. Isolated From Poultry." **Jundishapur Journal of Microbiology**, 7, 9 (2014): e17824. *PMC*. Web. 16 Mar. 2016.
- OLIVEIRA, M. N. & PENNA, A. L. B. Prebióticos. In: OLIVEIRA, M. N. (Org.). ONGGO, I; FLEET, G.H. Media for the isolation and enumeration of lactic acid bacteria from yoghurts. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 48, n.2, p. 89–92, 1993
- ORDONEZ, G.A.; JEON, I.J.; ROBERTS, H.A. Manufacture of frozen yogurt with ultrafiltered milk and probiotic lactic acid bacteria. **J. Food Process. Preserv.**, v.24, p. 163-176, 2000.
- OTA, A. Protection against an infectious disease by enterohaemorrhagic *E. coli* 0-157. **Med Hypotheses**. v. 53. n. 1. p. 87-8, 1999.
- OTLES S. AND CAGINDI O. *Kefir*. A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Food Engineering Department**, v.2, p.54-59, 2003.

PAPADEMAS, P.; BINTSIS, T. Microbiology of ice cream and related products. In: ROBINSON, R. K. (Org.). **Dairy microbiology handbook**. 3.ed. New York: Wiley Inter-Science, 2002. cap. 6, p. 213-260.

PENNA, F.J. et al. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 76, p.209-217, 2000.

PENNINGS, B. et al. Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. **American Journal of Clinical Nutrition**. p. 93:997-100, 2011

PEREIRA, G. I. S. et al. Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 27 , n.3, p. 852-857, 2003

PFIZER. **Litesse**. New York: Pfizer Food Science, s.d. 5p. 2014 [catálogo]

PIERMARIA, J. A.; CANAL, M. L.; ABRAHAM, A. G. Gelling properties of *Kefiran*, a food-grade polysaccharide obtained from *Kefir* grain. **Food Hydrocolloids**, p.1-8, 2007.

PINEIRO, M.; STANTON, C. Probiotic bacteria: legislative framework – requirements to evidence basis. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, p. 850-853, 2007.

PINHEIRO, M. V. S.; PENNA, A. L. B. Substitutos de gordura: tipos e aplicações em produtos lácteos. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 175-186, 2004

PINHEIRO, M.V.S.; OLIVEIRA M.N.; PENNA A.L.B.; TAMINE A.Y. The effect of different sweeteners in low-calorie yogurts review. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.4, p.89-93, 2005.

PINTO, M.F.; PONSANO, E.H.G.; DELBEM, A.C.B. et al. Condições higiênico-sanitária de sorvetes fabricados por indústrias artesanais no município de Araçatuba - SP. **Higiene Alimentar**, v.14, n.72, p. 50-52, 2000.

PORTMANN, M.O.; KILCAST, D. Psychophysical characterization of new sweeteners of commercial importance for the EC food industry. **Food Chemistry**. v.56, n.3, p. 291-302, 1996.

POT, B.; TSAKALIDOU, E. **Taxonomy and metabolism of Lactobacillus**. In A. Ljungh, & T. Wadström (Eds.), *Lactobacillus molecular biology: From genomics to probiotics*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2009, p. 3-58
practices. 1998. 819p.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

REA, M.C.; LENNARTSSON, T.; DILLON, P.; DRINAN, F. D.; REVILLE, W. J.; HEAPES, M.; COGAN, M. Irish *Kefir* – like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 83-94, 1996.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher / Instituto Mauá de Tecnologia, p. 184, 2007.

RICHARDS, N.S.P.S. Soro Lácteo - Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente, **Food Ingredients**, n. 17, p. 20-27, 2002.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73, p. 406-409, 2001.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. 105-110, 2002.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 5, p.137-146, 1993.

ROBINSON, R. K. **Microbiology of frozen foods**. London, U. K.: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.

RODRIGUES, K.L., CARVALHO, J.C.T., SCHNEEDORF, J.M. Anti-inflammatory properties of *Kefir* and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, v. 13, n. 5–6, p. 485–492, 2005.

ROLLER, S. Starch-deriver fat mimetics: Maltodextrins. In: ROLLER, S.; JONES, S. (Ed) A. **Handbook of Fat Replacers**. Boca Raton: CRC Press, p 99-118, 1996.

RONDA, F.et al. Effects of polyols and nondigestible oligosaccharides on the quality of sugar-free sponge cakes. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 549-555, 2005.

ROSS, R.P.; DESMOND, C.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **J. Appl. Microbiol.**, v.98, p.1410-1417, 2005.

ROY, D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p. 167–182, 2001.

SAAD, S.M.I. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte**. Rev. Bras. Ciênc. Farm., v.42, n.1, p.1-16, 2006.

SABIR, F.; BEYATLI, Y.; COKMUS, C.; DARILMAZ, D. O. Assessment of Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. Strains Isolated from Kefir. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. 568- 573, 2010.

SACCARO, D.M. et al. Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. **Afr J Microbiol Res**, v. 6, p. 2239-2245, 2012.

- SANTOS, A.; SAN MAURO, A.; SANCHEZ, J.; TORRES, M.; MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from *Kefir*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 434-437, 2003.
- SANTOS, R. S. de. et al. Estudo da ingestão de cálcio por crianças atendidas em creches municipais de Teresina, Piauí. **Alim. Nutr.** São Paulo, n. 12. 2001. p. 69-81.
- SARKAR, S. Biotechnological innovations in *Kefir* production: a review. **British Food Journal**, v. 110, n. 3, p. 283-295, 2008.
- SARKAR, S. Potencial of *Kefir* as a dietetic beverage – a review. **British Food Journal**, v. 109, p. 280-290, 2007.
- SAULNIER, D. M. et al. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. **Curr. Opin. iotechnol.** v. 20, p.135–141, 2009.
- SAXELIN, M. et al. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Curr Opin Biotechnol.** 16:204–211, 2005
- SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **Int. Dairy J.**, v.17, p.1262-1277, 2007.
- SHOEVERS, A.; BRITZ, T. J. Influence of different culturing conditions on *Kefir* grain increase. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 183–187, 2003.
- SILVA, R. F. Use of inulin as a natural texture modifier. **Cereal Foods World**, v.41, n.10, p.792-795, 1996.
- SIMOVA, E.; BESHKOVA, D; ANGELOV, A.; HIRSTOZOVA, T. S; FRENGOVA, G; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in *Kefir* grains and *Kefir* made from them. **Journal Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 1-6. 2002
- SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M.N. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com “fat replacers”. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, vol 22, n°.1 Campinas, 2003.
- SOCCOL, C.R. et al.: The Potential of Probiotics, Food Technol. Biotechnol. 48 (4) 413–434, 2010.
- SOLER, M. P.; VEIGA, P. G. Série **Publicações Técnicas do Centro de Informação em Alimentos: sorvetes**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2001.
- STEFE, C. A. et al. Probióticos, prebióticos e simbióticos: Artigo de revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 16-33, jan-jun, 2008.
- STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory Evaluation Practices**. 3º ed. Academic Press, New York, NY. 2004. 408p.

SÜLE, J. et al. Evaluation of culture media for selective enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, p. 1023–1030, 2014

TABASCO, R. et al. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. **Int. Dairy J.**, v. 17, 2007, p. 1107–1114

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. **International Dairy Journal**, v.14, p. 142–149, 2004.

TAMIME, A. Y. ROBINSON, R. K. **Yogur; ciencia y tecnologia**. Traducido por Maria de la Concepción Díaz de Villegas Soláns e Alvaro Rodríguez Sánchez Arévalo. Zaragoza: Acribia, 1991, 368p.

TAPER, H.S.; ROBERFROID, M.B. Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1488s- 1489s, 1999.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

THARMARAJ, N; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. **J Dairy Sci**, v. 86, p. 2288-2296, 2013

THUNELL, R. K., SANDINE, E., ; BODYFELT, F. W. Frozen starters from internal-pH control-grown cultures. **Journal of Dairy Science**. v.67, p. 24–36, 1984.

TIESZEN, K.M.; BAER, R.J. Composition and microbiology quality of frozen yogurts. **Cult. Dairy Prod. J.** v.24, p.11-14, 1989.

VAN CASTEELE, S. et. al. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. **Int Dairy J.** v.16, 2006, p.1470-1476

VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p. 37-44, 2001.

VINDEROLA, C.G. REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v.10, p. 271–275, 1999.

VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, p.271-275, 2000.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Cream products. In: WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. (Org.). **Dairy technology**: principles of milk properties and processes. New York: Marcel Dekker, 1999. cap. 15, p. 405-424.

WANG, X.; GIBSON, G. R. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **J Appl Bacteriol**, Cambridge, v.74, n.4, p.373-380, 1993.

WANG, Y. F.; HUO, G. C.; LIU, L. B. Isolation and identification of the lactic acid bacteria from *Kefir* grains. **China Dairy Industry**, v. 32, p. 17-19, 2004.

WANG, Y. Prebiotics: present and future in food Science and technology. **Food Research International**, Essex, v. 42, p; 8-12, 2009.

WEI, S.H.; CHEN, Y.P.; CHEN, M.J. Selecting probiotics with the abilities of enhancing GLP-1 to mitigate the progression of type 1 diabetes in vitro and in vivo. **Journal of Functional Foods**. v. 18, p. 473-486, 2015.

WIT, J.N. de. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.597-608, 1998.

WIT, J.N. de.; KLARENBECK, G. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. **Journal of Dairy Science**. v.7, n.11, p.2701-2710, 1984.

WITTHUHM, R. C.; CILLIERS, A.; BRITZ, T. J. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of *Kefir* grains. **Journal Dairy Research**, v. 72, p. 125-128, 2005.

WITTHUHM, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T.J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African *Kefir* grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 33-37, 2004.

WONG, N. P et.al. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. 3^a ed.; New York: Aspen Publication, 779p., 1999.

WSZOLEK ,M., TAMIME, A.Y., MUIR, D.D., BARCLAY, M.N. Properties of *Kefir* made in Scotland and Poland using Bovine, Caprine and Ovine Milk with different Starter Cultures. **Lebensm.- Wiss. u.- Technol.**, v. 34, p. 251-261. 2001.

YADA, R. **Protein in Food Processing**. England: Woodhear Publishing, 2004.

YOUNG, C.K. et al. Acceptability of frozen desserts made with neutralized, hydrolyzed, fluid cottage cheese whey. **J. Food Sci.**, v.45, n.4, p.805-809, 1980.

YÜKSEKDAG, Z. N.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish *Kefirs* with natural probiotic. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 37, p. 663-667, 2004.

ZANIRATI, D. F. **Caracterização de bactérias lácticas da microbiota de grãos de kefir cultivados em leite ou água com açúcar mascavo por metodologias dependentes e independentes de cultivo**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

ZHENG Y. L. et al. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolates from Tibetan kefir grains. **PLoS ONE**, v. 8 , p. e69868, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Padrão microbiológico para sorvetes

De acordo com a Portaria nº 451/97, do Ministério da Saúde, que estabelece os critérios e padrões microbiológicos para alimentos, as características avaliadas para sorvetes foram as seguintes:

- Para *S. aureus*, a legislação estabelece o padrão microbiológico para gelados comestíveis, contagem de no máximo 10^3 UFC/g.
- Para *Salmonella* a legislação estabelece o padrão microbiológico para gelados comestíveis, contagem ausente em 25g do produto.
- Para Coliformes totais, a legislação estabelece o padrão microbiológico para gelados comestíveis, contagem de no máximo 10^2 UFC/g.

Para Coliformes a 45°C , a legislação estabelece o padrão microbiológico para gelados comestíveis, contagem de no máximo 5×10 UFC/g.

As análises de Contagem Padrão em Placa e Coliformes Totais são indicativas de condições higiênicas inadequadas de processamento e de armazenamento dos produtos. Quanto maior o número de bactérias dessas classes, mais deficientes são as condições de higiene na fabricação, menor a durabilidade do produto e maiores os riscos à saúde dos consumidores.

A contaminação pela bactéria *Staphylococcus Aureus*, também está relacionada às condições higiênicas durante a fabricação, produz uma toxina que, quando ingerida, causa em um prazo de tempo que varia de 30 minutos a 8 horas, intoxicação alimentar, provocando náuseas, vômitos e diarreia. Além disso, essa bactéria pode causar as feridas, vulgarmente conhecidas como "furúnculos".

A contaminação causada pela *Salmonella* também ocorre através de manipulação inadequada, sendo a causadora de graves problemas à saúde, principalmente, gastrointestinais e dores de cabeça, seguidas de vômito e diarreia.

APÊNDICE B

Alinhamento das sequências obtidas pelo sequenciamento do gene rRNA 16S com as sequências depositadas GenBank, utilizando o algoritmo BLASTn.

Canaleta 2 (Amostra SWI) Similaridade com *Lactobacillus kefir* - acesso NCBI KF149453; localização no gene : <1..>1367; product="16S ribosomal RNA"

```
CSTGCCACKTGGTCTTAGGTTKAAAGAYGGCTTCGGCTATCAYTTTAGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTTGTT
GGTAAGGTAATGGCCTACCAAGGCRATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGC
GTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACAGGTGTCARAGTAACTGTTGACATC
TTGACGGTATCCWASCAGAAAGCCACGGCKAACTACGTGCCAGCAGCCGSGGKAATACGTAGGTGGCARGCGKTG
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTASGTCTGATGTGAAAGCCTTSGGCTTAACCGGAG
AAGTGCATCGGAAACCAGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCRTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACRGTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAG
CGAACAGGATTAGATACYCTGGTAGTCCATGCCGTAMACGATGAGTGCCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCA
GTGCTGCAGCTRACGCATTAAGCACTCCGCTGGRGAGTACGACMGCACGGTGAAGTCAAGGAATTGACGSSGS
GCTCGCACAMSGGTGCAKCATGTGGTTTACTTCGATGCTACGCMAGATSCTKAYCAGGTCGTTTCGACATCCTG
CWGCCACCTAASAGRTTATGSCGATTGCCTCKSGGAMTGAKYGACAGYGTTCATGCATRTCTGACGAATCGKAT
CGTGCAWCGGTTGAGCTTCAAGTACACKWCACG
```

```
Query 5 CCACKTGGTCTTAGGTTKAAAGAYGGCTTCGGCTATCAYTTTAGGATGGACCCGCGGCGT 64
      ||| | ||||| | | | |||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 122 CCACATGGTCTTGGTTTAAAGATGGCTTCGGCTATCATTAGGATGGACCCGCGGCGT 181

Query 65 ATTAGCTTGTTGGTAAGGTAATGGCCTACCAAGGCRATGATACGTAGCCGACCTGAGAGG 124
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 182 ATTAGCTTGTTGGTAAGGTAATGGCCTACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGG 241

Query 125 GTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG 184
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 242 GTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG 301

Query 185 AATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTC 244
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 302 AATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTC 361

Query 245 GGCTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACAGGTGTCARAGTAACTGTTGACATCTTGA 304
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 362 GGCTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACAGGTGTCAGAGTAACTGTTGACATCTTGA 421

Query 305 CGGTATCCWASCAGAAAGCCACGGCKAACTACGTGCCAGCAGCCGSGGKAATACGTAGGT 364
      ||||| | | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 422 CGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT 481
```



```

|||||
Sbjct 650 AGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTG 709

Query 545 GCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACA 604
|||||
Sbjct 710 GCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACA 769

Query 605 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAARCGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTC 664
|||||
Sbjct 770 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAARCGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTC 829

Query 665 CGCCCTTCAGTGTGCAGCTRACGCATTAAGCASTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGG 724
|||||
Sbjct 830 CGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGG 889

Query 725 TTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCYCGCACAAGCGGGTGGAKCATGTGGTTTACTTC 784
|||||
Sbjct 890 TTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC-GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTC 948

Query 785 GATGCTACGCGAAGAAGGTTACCAGGTCT-GACATCCTTCTGCCAACCT-AGAGRTTATG 842
|||||
Sbjct 949 GATGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACAT-CTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGG 1007

Query 843 CGATCC-TTCGGG-AMTGA-TGACAGK--GTGCATGCTGTCGTCAGCTCGTGTGGTGAG 897
|| ||| ||||| | || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1008 CGTTCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGCG-TGAG 1066

Query 898 AATGKTTGGGTTMAAG 913
| || ||||| |||
Sbjct 1067 A-TG-TTGGGTT-AAG 1079

```

Canaleta 5 (Amostra SWP) Similaridade com *Lactobacillus kefir* acesso NCBI
 KF149170; localização no gene : < 1 to 1351; product="16S ribosomal RNA"

```

CCCCCACCATGGCTTTTAGRTTKAAAGAYGGCTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACSCGCGGCGTATTAKCTTG
TTGGTAAGGTAATGGCCTACCAAGGCRAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAG
ACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACAGGTGTCCARAGTAACTGTTGACA
TCTTGACGGTATCCWASCAGAAAAGCCACGGCTAACTACKTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTASGTGGCARGCGT
TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTASGTCTGATGTGAAASCCTTSKGCTTAACCGG
AGAAGTGCATCGGAAACCAKAGACTTGAGTGCARAAGAGGACAGTGGAACTCCRTGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATATGGAAGAACAACCAKAGACTTGAGTGCARAAGAGGACAGTGGAACTCCRTGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGKAMACRATGAGTGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTT
CAGTGTGTCAGCTRACRCATTAACGCASTCCGCCWGSAGAGTAYKACMGCWCRGTYGAMASTCAMARSAATTG
ACSGSGSCCCGCACMATSGGGTGKSAKYCATGTGGATTTACTCAGATGCTACGCTGAASAACCTTAYCAAGTCTG

```


Sbjct 243 AGGTAATGGCCTACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATT 302

 Query 143 GGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGG 202
 |||
 Sbjct 303 GGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGG 362

 Query 203 ACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCT 262
 |||
 Sbjct 363 ACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCT 422

 Query 263 GTTGTGGAGAAGAACAGGTGTCAAAGTAACTGTTGACATCTTGACGGTATCCAASCAGA 322
 |||
 Sbjct 423 GTTGTGGAGAAGAACAGGTGTGAGAGTAACTGTTGACATCTTGACGGTATCCAACCAGA 482

 Query 323 AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG 382
 |||
 Sbjct 483 AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG 542

 Query 383 GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTSGG 442
 |||
 Sbjct 543 GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCCG 602

 Query 443 CTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCAGGAGACKTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAAC 502
 |||
 Sbjct 603 CTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCAGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAAC 662

 Query 503 TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG 562
 |||
 Sbjct 663 TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG 722

 Query 563 TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC 622
 |||
 Sbjct 723 TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC 782

 Query 623 TGGTAGTCCATGCCGKAAACAATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGC 682
 |||
 Sbjct 783 TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGC 842

 Query 683 TGCAGCTAACGCATTAAGCASTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG-AACTCAAAG 741
 |||
 Sbjct 843 TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG 902

 Query 742 GAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGT-GAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCTACGCG-A 799


```

|||||
Sbjct 552 CTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCAGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAC 611

Query 500 TCCRTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG 559
|||
Sbjct 612 TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG 671

Query 560 TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC 619
|||||
Sbjct 672 TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC 731

Query 620 TGGTAGTCCATGCCGAAACRATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGC 679
|||||
Sbjct 732 TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGC 791

Query 680 TGCAGCTRACGCATTAAGCAGTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG 739
|||||
Sbjct 792 TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG 851

Query 740 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCTACGCGAAG 799
|||||
Sbjct 852 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCTACGCGAAG 911

Query 800 AG-CTTACCAGGTCGTGACATCT-CTGCCA-C-T-AGAGATTATGCGTTCCTTCGGG-A 853
| |||||
Sbjct 912 AACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCTTCGGGGA 971

Query 854 C-G-ATGACAGGTGGTGCATGC-TGTCGTCAGMTCG-GTCCGTGM-ATGTTGRGATCAAG 908
| |||||
Sbjct 972 CAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCCGTGAGATGTTGGGTT-AAG 1030

Query 909 TCCMGCAA 916
|||
Sbjct 1031 TCCCGCAA 1038

```

APÊNDICE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO NA FORMA DE CONVITE PARA SORVETE PROBIÓTICO A BASE DE SORO PROTÉICO FERMENTADO COM *KEFIR* NA ANÁLISE DE ACEITAÇÃO

Título da pesquisa: “Desenvolvimento de Sorvete Probiótico diet a base de soro protéico fermentado com *Kefir*”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “Desenvolvimento de Sorvete Probiótico a base de soro protéico fermentado com *Kefir*”, realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da UEL, Londrina-PR. O objetivo da pesquisa é desenvolver um sorvete probiótico fermentado com *Kefir* a base de soro protéico. A sua participação é muito importante e irá requerer cerca de quinze minutos. Você participará como provador e irá consumir um sorvete probiótico fermentado com *Kefir* a base de soro protéico isolado, sendo solicitado a dar sua opinião se gostou ou não do produto. Será realizada uma sessão e você poderá participar no horário em que tiver maior disponibilidade. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Os benefícios esperados são manutenção do trânsito intestinal, as propriedades funcionais do soro protéico melhorem as características texturais do sorvete, substituindo parcialmente ou totalmente outros ingredientes, como gordura, açúcares, resultando em um produto probiótico, seguro, funcional, com menor teor de gordura, baixo teor de açúcares, baixo teor de lactose e baixas calorias. A sua ingestão não traz riscos à saúde, entretanto, raramente, podem ocorrer desconfortos abdominais, como dores, flatulência ou aumento na velocidade do trânsito intestinal, que deverão cessar algumas horas após o consumo do produto. Informamos que não haverá custos, nem remuneração por sua participação da pesquisa. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia ou Paulo Terumitsu Saito, DCTA-UEL) no telefone (43) 3371-5966 ou no e-mail sgarcia@uel.br / paulinho_badaui_sephirothdark@hotmail.com, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, localizado na Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380 (PR 445) - Campus Universitário. Este termo deverá ser preenchido e assinado em duas vias de igual teor, sendo uma delas entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 2015.

Pesquisador Responsável

Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia

Mestrando

Paulo Terumitsu Saito

(nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

APÊNDICE D**FICHA DE RECRUTAMENTO DE PROVADORES
PARA TESTE DE ACEITAÇÃO E TERMO DE CONSENTIMENTO**

1. Faixa etária: 2. Sexo:
() 15-25 () masculino
() 25-35 () feminino
() 35-50
() acima de 50 anos
3. Ocupação: 4. Escolaridade:
() aluno _____ () 1º grau
() funcionário () 2º grau
() professor () 3º grau
() outro _____ () outro _____
5. Gosta de *iogurte*? () Sim () Não
6. Frequência de consumo de *sorvete*:
() Nunca
() Ocasionalmente - _____ vezes por ano
() Moderadamente - _____ vezes por mês
() Frequentemente - _____ vezes por semana
7. Frequência de consumo de sorvete fermentado:
() Nunca
() Ocasionalmente - _____ vezes por ano
() Moderadamente - _____ vezes por mês
() Frequentemente - _____ vezes por semana
8. Já teve a oportunidade de experimentar sorvete fermentado? O sorvete é fermentado com *Kefir*, onde originalmente, o *Kefir* é fermentado de leite que se parece com iogurte
() Sim
() Não

APÊNDICE E
FICHA TESTE DE ACEITAÇÃO

Nome:

Data:

Avalie a amostra de sorvete, usando a escala abaixo para descrever o quanto gostou ou desgostou do produto.

- 1-Desgostei muitíssimo
- 2-Desgostei muito
- 3-Desgostei moderadamente
- 4-Desgostei ligeiramente
- 5-Nem gostei nem desgostei
- 6-Gostei ligeiramente
- 7-Gostei moderadamente
- 8-Gostei muito
- 9-Gostei muitíssimo

Amostras				
Aparência (aspecto)				
Odor (Aroma)				
Cor				
Sabor				
Textura				
Nota global				

Intenção de Consumo

- 1-Nunca comeria
- 2-Não comeria sempre
- 3-Não comeria moderadamente
- 4-Não comeria ligeiramente
- 5-Comeria e não comeria
- 6-Comeria ocasionalmente
- 7-Comeria moderadamente
- 8-Comeria muito
- 9-Comeria sempre

Amostra: _____: _____: _____: _____:

Comentários: _____

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO PROJETO DE DISSERTAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	225/2013
CAAE:	21645813.2.0000.5231
Data da Relatoria:	13/12/2013
Pesquisador(a):	Sandra Garcia
Unidade/Órgão:	CCA - Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

Prezado(a) Senhor(a):


O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"DESENVOLVIMENTO DE SORVETE PROBIÓTICO À BASE DE SORO PROTÉICO FERMENTADO COM KEFIR"

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 13 de dezembro de 2013.



Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina



ANEXO 2 - INFORMAÇÕES TÉCNICAS DA INULINA Frutafit IQ, SENSUS

Frutafit® IQ
version 2009.01/a (November 2009)

Description
Frutafit® IQ is a native inulin/oligofructose. It is a natural food ingredient extracted from chicory roots. Frutafit® IQ is an agglomerated powder resulting in an excellent dispersability and wettability. Therefore Frutafit® IQ is a perfect ingredient for instant applications.

Inulin from chicory is a polydisperse mixture of linear fructose polymers with mostly a terminal glucose unit, coupled by means of $\beta(2-1)$ bonds. The number of units (degree of polymerisation) can vary between 2 and 60.

Specification
(Method of analysis available on request)

Physical aspects

Dry matter content	95-99%
--------------------	--------

Composition on dry matter

Carbohydrates	$\geq 99.5\%$
Inulin	$\geq 90\%$
Fructose, glucose, sucrose	$\leq 10\%$
Average chain length	8-13 monomers
Ash	$\leq 0.2\%$
Heavy metals	
Pb, As	each ≤ 0.1 mg/kg
Cd, Hg	each ≤ 0.01 mg/kg

Microbiology

Aerobic plate count (30°C)	≤ 1000 CFU/gram
Aerobic plate count (55°C)	≤ 1000 CFU/gram
Moulds	≤ 20 CFU/gram
Yeasts	≤ 20 CFU/gram
<i>Bacillus cereus</i>	≤ 100 CFU/gram
<i>Listeria monocytogenes</i>	absent/25 grams
Enterobacteriaceae	absent/gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	absent/gram
<i>Salmonella</i>	absent/25 grams

Nutritional information
All values are averages expressed per 100 grams Frutafit® IQ:

Carbohydrates:	97 grams
- digestible (sugars)	7 grams
- non-digestible (dietary fiber, inulin)	90 grams
Proteins	0 gram
Fats	0 gram
Dietary fibers (AOAC 997.08)	90 grams
Moisture	3 grams
Minerals:	
- Sodium	40 mg
- Calcium	11.5 mg
- Potassium	7.5 mg
- Iron	0.4 mg
- Other minerals	negligible
Vitamins	negligible
Cholesterol	absent
Gluten	absent
Lactose	absent
Folate	absent
Insecticides, pesticides	absent
Enzymatic activity	absent
Color, flavor, preservatives	absent
Caloric value	1.2 kcal/gram ¹
Glycaemic response	14 ²

¹ Calculated value based on 1 kcal/gram pure inulin. Please check local legislation and adapt if necessary.
² The effect on the blood glucose level of 25 gram carbohydrate coming from Frutafit® IQ is compared with the effect on blood glucose level of 25 gram glucose (control=100).

The information and recommendations in this publication are to the best of our knowledge. Sensus cannot be held responsible for the application of its products in violation with existing regulations and/or licences.

ANEXO 3 - INFORMAÇÕES TÉCNICAS DA POLIDEXTROSE, TATE & LYLE

TATE & LYLE

Page 4 of 4
Repeat printout

CERTIFICATE OF ANALYSIS

SEND TO:
TOVANI BENZAQUEN COM IMP EXP REP L
SANTOS PORT-BRAZIL
CNPJ: 69.170.462/0001-53
CEP 01228-200
AV. ANGELICA, NO. 2.220-9°. ANDAR
02037-000 SAO PAULO - SP
BRAZIL

ATTN: QC

PRODUCT: STA-LITE® III 25KG Bag
(Polidextrose)

PO #: TB 1891213

ORDER #: 4335197

DELIVERY #: 86807311

REPORT DATE: 27.12.2013

CARRIER ID: SUDU7887494 936 - CLIW

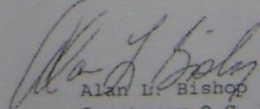
DATE SHIPPED: 19.12.2013

ANALYTICAL DATA		SPECIFICATIONS	
INSPECTION LOT 80000146398		MIN	MAX
LOT NUMBER DZ3K262D91			
MFG DATE 26.10.2013			
255,000	55.115 LB BAG		
MOISTURE	% 2,50	0,00	4,00
SEDIMENT	PPM 2	0	16
COLOR	2,6	0,0	4,0
pH	4,4	4,0	6,0
DEXTROSE	% 3,50	0,00	4,00
SORBITOL	% 1,60	0,00	2,00
LEVOGLUCOSAN	% 1,60	0,00	4,00
% POLYDEX	93,30	90,00	100,00
SCR ON 60	% 30,40	0,00	42,00
SCR THRU 140	% 35,90	0,00	50,00
HMF POLDEX	PPM 4	0	45
BACTER TOTAL	CFG < 10	0	1000
OSMOPH YEAST	CFG < 10	0	100
OSMOPH MOLD	CFG < 10	0	100
Salmonella/375g	Negative		
COLIFORMS	None Detected		
E-COLI	None Detected		
ACID POLYDEX	% 0,01	0,00	100,00

This product meets the requirements of the current edition of the Food Chemical Codex.
The limit of detection for both coliforms and E. coli is < 3 CFU/g.

REFINERY LOCATION: Decatur, IL
SEALS: 9362


REPORTED BY:



Alan L. Bishop
Sweetener Q.C. Lab Manager
2200 E. Eldorado Street
Decatur, IL 62521
Ph 866-772-7367

Tate & Lyle Ingredients Americas LLC
2200 E. Eldorado Street, Decatur, IL 62521
Telephone (217) 423-4411 Facsimile (217) 421-2216

ANEXO 4 - INFORMAÇÕES TÉCNICAS DA MALTODEXTRINA - Maltogill® 20, Cargill

Maltogill® 20		Ficha Técnica	Rev. 07 / 13																																							
<p>Descrição Maltogill® 20 é um produto obtido pela conversão enzimática do amido de milho, gerando uma mistura de sacarídeos, formada por unidades de D-glicose.</p>		<p>Alergênicos</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>SIM</th> <th>NÃO</th> <th>ALERGÊNICOS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Cereais que contêm glúten e seus derivados.</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Crustáceos e seus derivados.</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Ovos e seus derivados.</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Peixes e seus derivados.</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Amendoim e seus derivados.</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Soja e seus derivados.</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Leite e seus derivados (incluindo lactose).</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Frutos de casca rija e seus derivados.</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Aipo e seus derivados.</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Mostarda e seus derivados.</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Gergelim e seus derivados.*</td> </tr> <tr> <td></td> <td>X</td> <td>Dióxido de enxofre.</td> </tr> </tbody> </table>		SIM	NÃO	ALERGÊNICOS		X	Cereais que contêm glúten e seus derivados.		X	Crustáceos e seus derivados.		X	Ovos e seus derivados.		X	Peixes e seus derivados.		X	Amendoim e seus derivados.		X	Soja e seus derivados.		X	Leite e seus derivados (incluindo lactose).		X	Frutos de casca rija e seus derivados.		X	Aipo e seus derivados.		X	Mostarda e seus derivados.		X	Gergelim e seus derivados.*		X	Dióxido de enxofre.
SIM	NÃO	ALERGÊNICOS																																								
	X	Cereais que contêm glúten e seus derivados.																																								
	X	Crustáceos e seus derivados.																																								
	X	Ovos e seus derivados.																																								
	X	Peixes e seus derivados.																																								
	X	Amendoim e seus derivados.																																								
	X	Soja e seus derivados.																																								
	X	Leite e seus derivados (incluindo lactose).																																								
	X	Frutos de casca rija e seus derivados.																																								
	X	Aipo e seus derivados.																																								
	X	Mostarda e seus derivados.																																								
	X	Gergelim e seus derivados.*																																								
	X	Dióxido de enxofre.																																								
<p>Aplicação Achocolatados, drageados, pré-misturas para panificação e sorvetes, sobremesas lácteas e pós para bebidas.</p>																																										
<p>Especificações</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Umidade (%)</td> <td>máx. 5,0</td> </tr> <tr> <td>Dextrose Equivalente (%)</td> <td>19,0 – 23,0</td> </tr> <tr> <td>p.H. (solução 10%)</td> <td>4,5 – 5,5</td> </tr> <tr> <td>Cinzas (%)</td> <td>máx. 0,4</td> </tr> <tr> <td>SO₂(p.p.m.)</td> <td>máx. 20,0</td> </tr> </tbody> </table>		Umidade (%)	máx. 5,0	Dextrose Equivalente (%)	19,0 – 23,0	p.H. (solução 10%)	4,5 – 5,5	Cinzas (%)	máx. 0,4	SO ₂ (p.p.m.)	máx. 20,0																															
Umidade (%)	máx. 5,0																																									
Dextrose Equivalente (%)	19,0 – 23,0																																									
p.H. (solução 10%)	4,5 – 5,5																																									
Cinzas (%)	máx. 0,4																																									
SO ₂ (p.p.m.)	máx. 20,0																																									
<p>Informações Sensoriais</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Aspecto</td> <td>pó branco</td> </tr> <tr> <td>Sabor</td> <td>levemente doce</td> </tr> </tbody> </table>		Aspecto	pó branco	Sabor	levemente doce																																					
Aspecto	pó branco																																									
Sabor	levemente doce																																									
<p>Embalagem / Peso Líquido Sacos de papel multifolhados com revestimento de Polietileno de 25 kg.</p>		<p>Informações Nutricionais</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Porção de 100g</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Valor Nutricional</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Valor Energético</td> <td>380 kcal (1590 kJ)</td> </tr> <tr> <td>Carboidratos</td> <td>95,0 g</td> </tr> <tr> <td>Proteínas</td> <td>< 0,1 g</td> </tr> <tr> <td>Gorduras Totais</td> <td>0,0 g</td> </tr> <tr> <td>Gorduras Saturadas</td> <td>0,0 g</td> </tr> <tr> <td>Gorduras Trans</td> <td>0,0 g (teórico)</td> </tr> <tr> <td>Fibra alimentar</td> <td>0,0 g</td> </tr> <tr> <td>Sódio</td> <td>< 100 mg</td> </tr> </tbody> </table>		Porção de 100g		Valor Nutricional		Valor Energético	380 kcal (1590 kJ)	Carboidratos	95,0 g	Proteínas	< 0,1 g	Gorduras Totais	0,0 g	Gorduras Saturadas	0,0 g	Gorduras Trans	0,0 g (teórico)	Fibra alimentar	0,0 g	Sódio	< 100 mg																			
Porção de 100g																																										
Valor Nutricional																																										
Valor Energético	380 kcal (1590 kJ)																																									
Carboidratos	95,0 g																																									
Proteínas	< 0,1 g																																									
Gorduras Totais	0,0 g																																									
Gorduras Saturadas	0,0 g																																									
Gorduras Trans	0,0 g (teórico)																																									
Fibra alimentar	0,0 g																																									
Sódio	< 100 mg																																									
<p>Validade 12 meses a partir da data de produção, desde que estocado sob condições adequadas.</p>																																										
<p>Condições de Armazenamento Armazenar em local seco e ventilado, ao abrigo do sol e umidade, na embalagem original fechada e protegida do contato direto com o solo.</p>																																										
<p>Transporte Veículos fechados, livres de materiais e odores estranhos.</p>		<p>CONTATO Cargill Agrícola S.A. Av. Morumbi, 8.234 – Brooklin 04703-002 – São Paulo-SP Tel. 34 3218-5393 / 34 3218-5194 34 3218-6409 / 34 3218-6195 www.cargill.com.br</p>																																								
<p>As informações contidas neste documento foram compiladas de nossa experiência e de várias publicações técnicas tidas como verdadeiras. O único propósito deste documento é ser um guia para o manuseio apropriado do material. É de responsabilidade do usuário determinar a adequação destas informações para seu uso particular.</p>																																										
																																										

ANEXO 5 - INFORMAÇÕES TÉCNICAS DA ERITRITOL, Zerose erythritol, Cargill

technical data

Zerose™ erythritol STANDARD GRANULAR

Product Description
Zerose™ erythritol standard granular is a high purity, white crystalline powder of erythritol produced by fermentation of carbohydrates.

Application / Functionality
Zerose™ erythritol standard granular is recommended for use in sugar-free, calorie-reduced, sugar-reduced crystallized confectionery, fruit preparations, jams, baked goods, condiments, sauces, toppings, syrups, chocolate coatings, frozen dairy and non-dairy desserts, and beverages. It provides taste improvement and qualitative synergy to high potency sweeteners in soft drinks and helps to mask the bitter taste in tea flavors. Erythritol can be used in solution at low concentration.

Chemical and Physical Data

Attribute	Spec
Purity (%)	≥ 99.50
Ribitol & Glycerol (%)	≤ 0.10
Moisture (%)	≤ 0.15
pH	5.0-7.0
Reducing Sugars (%)	≤ 0.30
Granulation <250µm (%)	≤ 20.0
Lead (ppm)	≤ 0.5

Microbiological Data

Attribute	Spec
Total plate Count (cfu/g)	≤ 300
Yeast (cfu/g)	≤ 50
Molds (cfu/g)	≤ 50

Allergen Status
In accordance with the 2004 Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act (FALCPA), no allergen declarations are required for this product.

Sulphur dioxide and sulfites at a concentration of less than 10 ppm.

Nutritional Information

Calories	0	Cal/100g
Calories from Fat	0	Cal/100g
Total Fat	0	g/100g
Saturated Fat	0	g/100g
Trans Fat	0	g/100g
Cholesterol	0	mg/100g
Sodium	1.1	mg/100g
Potassium	0.3	mg/100g
Total Carbohydrates	99.9	g/100g
Sugar alcohols	99.9	g/100g
Dietary Fiber	0	g/100g
Sugars	< 0.3	g/100g
Protein	0	g/100g
Calcium	2.3	mg/100g
Iron	0.1	mg/100g
Phosphorus	0.2	mg/100g
Magnesium	0.4	mg/100g
Zinc	0.4	mg/100g
Ash	< 0.1	g/100g

This product is not a significant source of Vitamin A, Vitamin C, Thiamine, Niacin, or Riboflavin.

These values are typical and not analyzed every lot.

Storage / Shelf-life
Product should be stored in a clean, dry, odor-free area at ambient temperature and humidity.

The recommended best before date for erythritol is 1,095 days (3 years) from date of manufacture.


For super sacks, the recommended best before date is 730 days (2 years) from date of manufacture.

Erythritol stored beyond the best before date should be tested periodically for fitness of use.

Packaging: Net 20 kg paper bags with inside PE lining and supersacks.

This information reflects US requirements for ingredients and allergens declaration. For countries other than US, please consult with local Cargill regulatory team.

collaborate > create > succeed™



ANEXO 6 - INFORMAÇÕES TÉCNICAS DO MALTITOL, SHANDONG

SHANDONG LUJIAN BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.
 TEL: (86) 534-7422888 FAX:(86) 534-7422488 E-MAIL: lj@ maltitol.com.cn Zc: 251200
 Add: yucheng high-tech development zone Shandong China Http: www.maltitol.com.cn

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Batch No.:2013120901

Product name	Maltitol Powder	Product date	Dec 09 2013
Analysis date	Dec 09 2013	Expiry date	Dec 08 2015
Item	Standard	Result	
Appearance	White crystal	Complied	
Taste	Typically sweet with no foreign taste	Complied	
Odour	No foreign odours	Complied	
Assay	99%-101%	99.69%	
Related products	≤1%	0.31%	
Water content	≤0.5%	0.09%	
Reducing sugar	≤0.1%	0.02%	
Specific rotation	+105.5°~ +108.5°	+107.1°	
Melting point	148℃--151℃	150.1℃	
Chloride	≤50 ppm	<50ppm	
Sulfate	≤100 ppm	<100ppm	
Lead	≤0.5 ppm	<0.5ppm	
Nickel	≤0.5 ppm	<0.5ppm	
Arsenic	≤0.5 ppm	<0.5ppm	
Heavy metals	≤10 ppm	<10ppm	
Sulfated ash	≤0.1%	0.04%	
Conductivity	≤20us/cm	5.27us/cm	
Viable counts	≤20cfu/g	10cfu/g	
Yeast	≤10cfu/g	<10cfu/g	
Moulds	≤10cfu/g	<10cfu/g	
Coliform organisms	Negative in 25g	Complied	
Salmonella	Negative in 25g	Complied	
Conclusion	This product is complied with the standard		
Remark	This analysis report is only fit for this batch product.		

Inspector: Songwei

Stamp:

Leader:

ANEXO 7 - INFORMAÇÕES TÉCNICAS DO ISOLADO PROTÉICO DE SORO, Alibra CL 3987

ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS

Alibra CL 3987

Composto Lácteo

1. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O composto lácteo Alibra CL 3987 é um produto lecitinado, a base de isolado protéico de soro, possui elevado conteúdo de proteínas, um perfil de sabores suaves, baixo conteúdo de lactose e gordura, propriedades estas que o tornam uma excelente escolha para diversas aplicações.

2. INGREDIENTES

Isolado protéico de soro de leite, leite em pó desnatado e emulsificante lecitina de soja. **NÃO CONTÉM GLÚTEN.**

3. ESPECIFICAÇÕES

3.1. CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

- Pó uniforme isento de substâncias estranhas.
- Sabor e odor suaves
- Excelente valor nutricional.
- Boa dispersibilidade e hidratação
- Boa solubilidade numa faixa ampla de pHs.

3.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Contagem Padrão de Mesófilos (UFC/g)	Máx. 50.000
Coliformes Totais (UFC)	Máx. 100
Coliformes Fecais (UFC)	Máx. 10
Estafilococos coag. positiva (UFC/g)	Máx. 100
Bolores e Leveduras (UFC/g)	Máx. 50
Salmonella SP/25g	Ausência

3.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

pH (solução 10%)	6,0 a 7,0
Umidade (%)	Máx. 4,5
Lipídeos (%)	Máx. 1,5
Proteínas (%) (base seca)	Mín. 90
Lactose (%)	Máx. 1,0
Cinzas (sais minerais) (%)	Máx. 3,0
Partículas Queimadas (ADPI)	Max. Disco B

4. APLICAÇÃO

Pode ser utilizado para várias aplicações na indústria de alimentos como bebidas fortificadas, bebidas para atletas, misturas nutricionais "shakes" e produtos dietéticos, em acordo com as boas práticas de fabricação.

5. INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL	
Porção de 100g	
Valor energético	371 kcal / 1553kJ
Carboidratos	3,5 g
Proteínas	88 g
Gorduras totais	0,9 g
Gorduras saturadas	0,4 g
Gorduras Polinsaturadas	0,16 g
Gorduras Monoinsaturadas	0,22 g
Gorduras Trans	0,02 g
Colesterol	1,9 mg
Fibras alimentares	0 g
Cálcio	472 mg
Ferro	0,60 mg
Sódio	201 mg
Potássio	600 mg
Magnésio	80 mg
Fósforo	350 mg

PERFIL DE AMINOÁCIDOS			
Aminoácido	g/100g de proteína	Aminoácido	g/100g de proteína
Ácido Aspártico	11,9	Tirosina	3,2
Treonina	8,0	Fenilalanina	3,1
Serina	5,3	Histidina	2,1
Ácido glutâmico	18,9	Lisina	8,8
Glicina	1,7	Arginina	2,2
Alanina	5,3	Prolina	7,8
Valina	6,3	Cistina	2,7
Isoleucina	7,2	Metionina	2,2
Leucina	11,2	Triptofano	1,9

6. ARMAZENAMENTO/CONSERVAÇÃO

Na embalagem original, à temperatura ambiente de 25°C e umidade relativa de 65%, ao abrigo da luz e calor, em local fresco, seco e arejado.

7. VALIDADE

12 meses a partir da data de fabricação, quando estocado nas condições recomendadas. Depois de aberta a embalagem, recomenda-se consumir o seu conteúdo em até 30 dias.

8. EMBALAGEM

Sacos de papel multifolhados, com saco de polietileno interno, contendo 20 kg.

9. TRANSPORTE

Transportar em veículo limpo, protegido contra umidade e calor, não devendo ser transportado com outros materiais que possam de alguma forma contaminar o produto.

10. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Nº do Registro - SIF/MAPA DIPOA sob nº 0099/4080 - Código - CL - 3987.

alibra ingredientes ltda