Artigo Técnico

CARACTERIZAÇÃO DE BEBIDA OBTIDA A PARTIR DE LEITE FERMENTADO SIMBIÓTICO ADICIONADO DE POLPA DE GOIABA E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS BIFIDOBACTÉRIAS

Characterization of beverage obtained from symbiotic fermented milk added guava pulp and evaluation of bifidobacteria viability

Darlila A. GALLINA[1*]
Adriane E. C. ANTUNES[2]
Natália C. AZAMBUJA-FERREIRA[3]
Jaqueline B. MENDONÇA[3]
Rosemeire A. NORBONA[3]

SUMÁRIO

Leites fermentados e iogurtes contendo probióticos são os principais produtos comercializados no mundo com alegação de promover saúde, atendendo a uma crescente demanda de mercado. Contudo, manter a viabilidade das culturas probióticas durante a fabricação e o armazenamento dos alimentos é um desafio tecnológico. O principal objetivo deste trabalho foi verificar a composição físico-química e a viabilidade dos probióticos por 1, 15 e 30 dias de estocagem refrigerada (4ºC±1) de uma bebida desenvolvida com uma mistura (50/50%) de polpa de goiaba pasteurizada e leite fermentado com cultura de iogurte, cultura mista de bifidobactérias, com e sem a adição de 1,7% de prebiótico (FOS). A viabilidade da cultura probiótica nas bebidas após 30 dias de estocagem refrigerada se manteve dentro do limite proposto pela legislação brasileira para alimentos com alegações de propriedades funcionais, com valores de 10^6 a 10^7 UFC.mL^{-1}, mesmo em condição desfavorável de pH (≤4,4). A adição de 1,7% de FOS não aumentou a viabilidade das bifidobactérias. Contudo, o emprego de 1,7% de FOS possibilita a ingestão de 3,4 gramas de fibras na porção diária (200mL) o que atende a legislação para alegação de propriedades funcionais.

Termos para Indexação: probióticos, prebióticos, produtos lácteos, contagem de bactérias.

SUMMARY

Fermented milks and yogurts containing probiotics are the main products in the world with health claims, attending to a growing market demand. However, to maintain the

1 Dra. Tecnologia de Alimentos, Pesquisador Científico, Tecnolat, ITAL. Campinas, SP, Brasil.
2 Dra. Alimentos e Nutrição, Profa. Faculdade de Ciências Aplicadas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil. E-mail: adriane.antunes@fca.unicamp.br.
3 Graduadas em Engenharia de Alimentos, Estagiárias (Tecnolat). Campinas, SP, Brasil. E-mails: nathy_egal@yahoo.com.br, jbmenal@yahoo.com.br.
4 Estagiária (Tecnolat). Campinas, SP, Brasil. E-mail: meireanholeto@yahoo.com.br.
* Autor para correspondência: Av. Brasil, 2880, Jardim Chapadão. CEP 13070-178, Campinas, SP, Brasil. E-mail: darlila@ital.sp.gov.br.

Recebido / Received: 27/09/2011
Aprovado / Approved: 27/02/2012

viability of probiotic cultures during manufacture and storage of food products is a technological challenge. The main objective of this study was to evaluate the physical-chemical composition and viability of probiotics after 1, 15 and 30 days of refrigerated storage (4ºC ± 1) of a beverage made with guava pulp pasteurized and fermented milk with cultured yoghurt (50/50%), mixed cultures of bifidobacteria, with and without the addition of 1.7% of prebiotics (FOS). The viability of probiotic beverages after 30 days of refrigerated storage has remained within the limit proposed by the Brazilian legislation for food with claims of functional properties with values from 10^6 to 10^7 UFC.mL^{-1}, even in unfavorable condition of pH (≤4,4). The addition of 1.7% of FOS did not increase the viability of bifidobacteria. However, the addition of 1.7% FOS enables the intake of 3.4 grams of fiber in the daily portion (200 ml) which meets the recommendation for functional properties.

Index Terms: probiotics, prebiotics, milk products, bacterial enumeration.

1 INTRODUÇÃO

Os consumidores estão atentos à composição dos produtos alimentícios e buscam cada vez mais alimentos que proporcionem benefícios a sua saúde. Neste foco, destacam-se os alimentos funcionais, os quais representam uma grande área de estudo e um mercado altamente promissor. De 2004 a 2006, as vendas de iogurtes funcionais no Brasil cresceram 400%. O mercado global de iogurtes deverá superar 67 bilhões de dólares até 2015, impulsionado pelo crescente desejo dos consumidores por produtos convenientes e promotores de saúde, especialmente os alimentos funcionais (GALLINA, 2010).

As fibras alimentares auxiliam no funcionamento do intestino. No Brasil, esta alegação pode ser utilizada para fibras solúveis e insolúveis desde que a porção diária forneça no mínimo 1,5 g por 100 mL, se o alimento for líquido, e 3 g de fibras no alimento sólido (ANVISA, 2008). A fibra solúvel não é digerida no estômago ou no intestino delgado e tem um papel importante na prevenção de doenças como hipercolesterolemia, obesidade e diabetes (GOLDBERG, 1994; SPILLER, 2001). Os prebióticos inulina e frutooligossacarídeos (FOS) são fibras solúveis que não alteram o valor calórico dos produtos, podem reduzir o índice glicêmico de alguns alimentos, são potencialmente capazes de melhorar a absorção de cálcio, ferro e magnésio. Além disso, servem como substrato para micro-organismos benéficos (probióticos).

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 2002), como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro. A alegação para produtos contendo probióticos deve indicar a espécie do micro-organismo presente que contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal. A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, o que corresponde ao consumo de 100 gramas contendo 10^6 a 10^7UFC/mL ou grama (ANVISA, 2008). As principais espécies microbianas com propriedades probióticas são pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Enquanto que os *Lactobacillus* são habitantes normais do intestino delgado humano onde combatem patógenos tais com *Salmonella* spp., *Bifidobacterium* é habitante do intestino grosso humano, onde inibe o crescimento de *Escherichia coli* e *Candida* spp. (AWAISHEH et al., 2005).

Produtos que contém uma combinação sinérgica de micro-organismos probióticos e substâncias prebióticas são denominados "simbióticos". Tais combinações podem apresentar vantagens tecnológicas e fisiológicas na medida em que possibilitam uma melhor viabilidade da cultura probiótica no produto e por estimularem o crescimento destas culturas no trato gastrointestinal do consumidor.

Culturas probióticas têm sido adicionadas para conferir propriedades funcionais aos alimentos, especialmente em leites fermentados e iogurtes. Contudo, a aplicação de probióticos em outras matrizes alimentares ainda é incipiente. Recomenda-se a diversificação dos produtos para atender a dietas para fins especiais. Enquanto que novos produtos devem ser desenvolvidos, produtos tradicionais devem ser aprimorados (PRADO et al., 2008).

A viabilidade e a estabilidade de culturas probióticas é o principal desafio tecnológico para as indústrias processadoras. Alimentos probióticos devem conter linhagens específicas de micro-organismos probióticos e manter um nível apropriado de células viáveis durante o armazenamento do produto, sem interferir no sabor e textura.

Sucos de frutas são consumidos e apreciados em todo o mundo, não só pelo seu sabor, mas também, por serem fontes de minerais e vitaminas. A aplicação de probióticos em sucos e similares demanda mais pesquisas para suplantar desafios

tecnológicos. A viabilidade dos probióticos depende de fatores tais como pH, temperatura de estocagem, nível de oxigênio, presença de microorganismos competidores e inibidores (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Ácidos orgânicos, por exemplo, prejudicam a sobrevivência de probióticos em sucos. O pH do suco é um fator determinante da viabilidade probiótica; valores de pH abaixo de 4 são prejudiciais para a maioria das cepas probióticas. Lactobacilos (especialmente *L. acidophilus* e *L.casei*) são geralmente considerados mais resistentes a meios ácidos que as bifidobactérias. Bifidobactérias são consideradas sensíveis em valores de pH abaixo de 4,6, e assim em sucos de frutas (cujos pH estão entre 3 e 4) são pobres veículos ou suportes de sua viabilidade e estabilidade (PAQUIN, 2009).

Manter a viabilidade e a estabilidade de culturas probióticas, ou seja, manter um nível apropriado de células viáveis durante o armazenamento do produto, dependendo da matriz e das características do meio, sem interferir no sabor e textura consiste em um desafio tecnológico. O principal objetivo deste trabalho foi verificar a composição físico-química e a viabilidade dos probióticos ao longo de 30 dias de estocagem refrigerada (4ºC±1) em uma bebida desenvolvida com uma mistura (50/50%) de polpa de goiaba pasteurizada e leite fermentado com cultura de iogurte, cultura mista de bifidobactérias, com e sem a adição de 1,7% de FOS.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Suspensão das culturas termofílicas e probióticas

Em fluxo laminar o envelope contendo a cultura mista probiótica liofilizada de Bifidobactérias (BIFI/CSL – *Bifidobacterium longum, B. infantis e B. breve*) foi aberto e dissolvido em 1L de leite tipo A integral estéril. Segundo o fabricante a quantidade total de células viáveis nos envelopes situa-se entre 10 e 11 log UFC. Foram então aliquotados em porções correspondentes à quantidade necessária para serem acrescidos à 1L de leite, transferidos para tubos estéreis (Falcon) e estocados a –20°C. A contagem correspondente aos probióticos após a aliquotagem da cultura liofilizada (fermento DVS) foi de 3 x 10^9 UFC/mL. Foram empregados 15mL desta alíquota no leite (por litro) para fermentação. Da mesma forma procedeu-se a aliquotagem da cultura termofílica (Jointec X3/CSL – *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*). Considerando a recomendação do fabricante, para fermentação foi utilizada uma alíquota de 2 mL adicionada ao leite (por litro).

2.2 Desenvolvimento da bebida simbiótica

Para o desenvolvimento da bebida empregou-se leite desnatado pasteurizado tipo A, o qual foi adicionado de açúcar (10%) e tratado termicamente a 85ºC durante 20-25 min., sendo então resfriado a 42-45ºC, adicionado de 3,4% da fibra prebiótica (oligofrutose – FOS, Orafti P95) e das culturas termofílica e probiótica para fermentação até pH 4,7-4,9. A fermentação foi interrompida neste pH tendo em vista que durante o processo de resfriamento ainda ocorre a acidificação do meio, e quanto mais baixo o pH final do produto mais prejudicial à viabilidade dos probióticos. Uma amostra de leite fermentado controle foi produzida sem a adição de FOS. Os leites fermentados foram adicionados de 6% de açúcar dissolvido em leite desnatado e tratado termicamente (85ºC/15min.), 0,03% de sorbato de potássio e polpa de goiaba pasteurizada na proporção de 50/50% (v/v). Empregou-se polpa de goiaba pasteurizada congelada (marca comercial De Marchi), a qual foi descongelada no momento do uso. As embalagens plásticas contendo a polpa foram higienizadas e abertas em fluxo laminar. As bebidas foram homogeneizadas em homogeneizador Armfield (60-70 kgf/cm^2), envasadas em frascos de vidro de 1 litro tipo Schott e acondicionadas em câmara fria (4±1ºC). O teor de sacarose foi calculado para resultar em 8% no produto final, sendo que uma parte foi adicionada antes da fermentação e outra após para não inibir o desenvolvimento dos probióticos. O fluxograma das etapas de fabricação é representado na Figura 1. As bebidas foram elaboradas em duplicata (n = 2).

2.3 Análises Físico-químicas

O leite pasteurizado desnatado empregado na elaboração das bebidas foi submetido às seguintes avaliações: pH, acidez, gordura total, extrato seco total, sólidos não gordurosos, proteína total e cinzas. A polpa de goiaba empregada na elaboração da bebida foi avaliada quanto ao pH, acidez e teor de sólidos solúveis (ºBrix).

As bebidas foram avaliadas após 1 dia de fabricação, quanto a viabilidade da cultura probiótica, composição físico-química (pH, acidez titulável, extrato seco total, gordura, proteína total, cinzas, carboidratos totais) e nos dias 15 e 30 de estocagem refrigerada quanto a viabilidade da cultura probiótica.

O pH, teor de acidez titulável, extrato seco total e gordura (pelo método Mojonnier) foram determinados de acordo com Brasil (2006). O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método oficial de Kjeldahl, segundo o International Dairy Federation (1993). O teor de proteína total foi

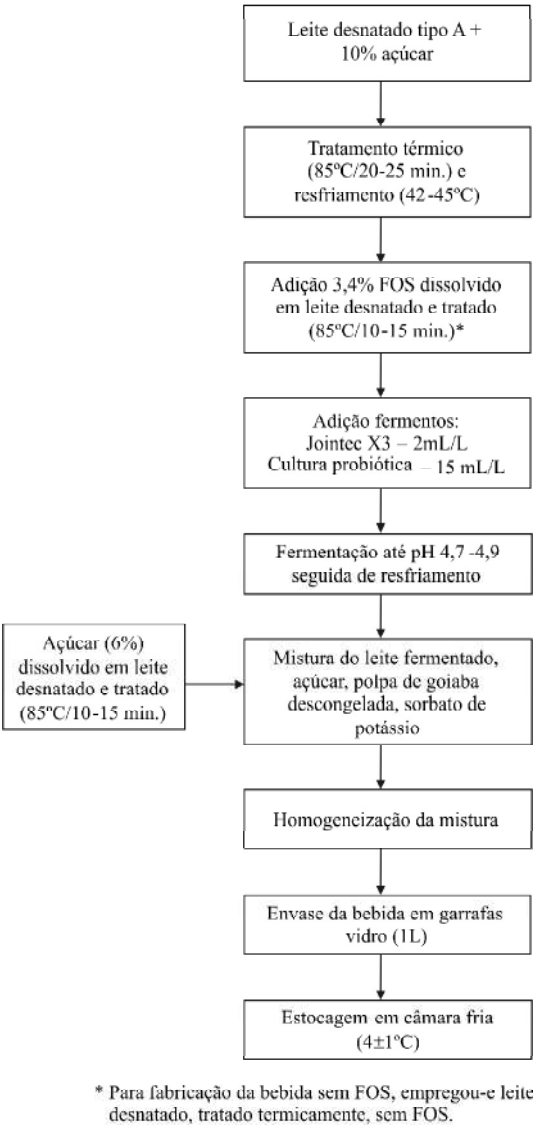

Figura 1 – Fluxograma das etapas de fabricação das bebidas.

calculado multiplicando-se o conteúdo de nitrogênio total por 6,38. O teor de resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinado de acordo com Horwitz (2000). O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença de acordo com a fórmula:

Carboidratos totais = [100 – (% umidade + % cinzas + % proteína + % gordura)].

As análises físico-químicas foram realizadas com triplicatas das amostras.

2.4 Análises Microbiológicas

Para contagem dos probióticos, tanto no fermento aliquotado quanto nas amostras foi utilizada a metodologia Boletim Técnico P-12 da Chr-Hansen, com adaptações à metodologia padrão da IDF nº 411/2007. O meio MRS Ágar foi

adicionado de 5mL de soluções estoque de dicloxacilina, 10mL de solução estoque de cloreto de lítio e 5mL de solução estoque de L-cisteína por litro de meio. A semeadura foi feita por profundidade e a incubação foi feita em anaerobiose (Anaerogen) a 37±1°C por 72±3 horas.

2.5 Análises Estatísticas

Os resultados da composição físico-química das formulações de bebida com FOS e sem FOS, após um dia de fabricação e das contagens de probióticos, após 1, 15 e 30 dias de estocagem a 4ºC foram analisados por meio de comparação das médias das amostras pelo Teste Tukey, ao nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados referentes às avaliações das matérias primas (leite desnatado e polpa de goiaba) empregadas na fabricação das bebidas.

Observa-se na Tabela 1 que os valores de pH (6,71) e acidez (16,66ºD) do leite pasteurizado desnatado estão dentro dos padrões normalmente encontrados para leite obtido em boas condições de higiene. O leite normalmente apresenta variações na sua composição, que pode ser afetada pela raça, alimentação e idade do animal, período de lactação e outros fatores (OLIVEIRA, 1986). Os valores de acidez, gordura, sólidos não gordurosos observados para o leite pasteurizado desnatado estão de acordo com o estabelecido pela Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002).

Verifica-se também na Tabela 1 que os valores de pH e acidez da polpa de goiaba estão de acordo com os obtidos por Evangelista e Vieites (2006), na avaliação da qualidade de polpa de goiaba congelada comercializada na cidade de São Paulo, cujas variações foram de 3,5 a 4,5 no pH; 0,28 a 0,86 g de ácido cítrico/100 g para a acidez e 5,67 a 11,27 para sólidos solúveis (ºBrix). De acordo com a legislação vigente, Padrão de Identidade e Qualidade para polpa de goiaba (BRASIL, 2000), o pH deve ser no mínimo 3,5 e no máximo 4,2; a acidez mínima deve ser 0,40% de ácido cítrico e o teor de ºBrix mínimo de 7,0. O pH da polpa de goiaba empregada neste estudo foi de 3,86 e o teor de sólidos solúveis foi 7ºBrix, estando em conformidade com a legislação; já a acidez (0,32%) foi levemente inferior ao valor estabelecido na legislação.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da caracterização físico-química das bebidas elaboradas na planta piloto (n = 2).

O pH das bebidas variou de 4,40 a 4,42, com e sem a adição de FOS. Estes valores foram obtidos após um dia de fabricação e estão relacionados à mistura e proporção empregada (50/50%) para a preparação dos produtos, cujo pH do leite fermentado era aproximadamente 4,8 e da polpa de goiaba era 3,86.

Os valores de acidez titulável obtidos para os produtos com e sem FOS foram similares (0,42/0,41 g ácido lático/100g). Estes valores são muito inferiores aos observados em leites fermentados, normalmente entre 0,6 e 1,0 g/100g de ácido lático. No entanto, a acidez observada na bebida está relacionada à mistura (leite fermentado e polpa de goiaba), tendo em vista que a mesma foi elaborada com leite fermentado com acidez aproximada de 0,7-0,8g de ácido lático/100g e polpa de goiaba com acidez de 0,32% de ácido cítrico. Valores menores de acidez são favoráveis, pois beneficiam a manutenção da viabilidade das bactérias probióticas

Tabela 1 – Valores médios das análises físico-químicas do leite pasteurizado desnatado tipo A e da polpa de goiaba empregados na fabricação das bebidas em planta piloto.

Análises \ amostras	Leite desnatado	Polpa de goiaba
pH	6,71	3,86
Acidez	0,17 (g ácido lático/100g)	0,32(% ácido cítrico)
Gordura (g/100g)	< 0,5	-
Cinzas (g/100g)	0,72	-
Nitrogênio total (g/100g)	0,46	-
Proteína total (g/100g)	2,92	-
EST* (g/100g)	8,71	-
SNG** (g/100g)	8,61	-
Carboidratos (g/100g)	4,98	-
° Brix (Sólidos Solúveis)	-	7

EST* = extrato seco total, SNG** = sólidos não gordurosos, - = não realizado

as quais são sensíveis à alta acidez. Além disto, a acidez exerce grande influência sobre os atributos de qualidade dos produtos lácteos fermentados e é um fator limitante de sua aceitação sensorial. Assim, uma acidez mais baixa pode favorecer a aceitabilidade do produto pelos consumidores (THAMER; PENNA, 2006).

Os teores de cinzas (0,5%) estão próximos aos observados para produtos lácteos fermentados com composições similares, em termos de sólidos totais e proteínas. Os teores de carboidratos totais estão dentro do esperado, considerando-se que a adição de sacarose foi efetuada para o produto final conter em torno de 8% de sacarose. A este valor (8%) deve-se somar o teor de lactose proveniente do leite desnatado (aproximadamente 5%) o que corresponde ao total observado, próximo a 13%. A bebida contendo 1,7% de FOS apresentou teor de carboidratos significativamente maior que a bebida sem FOS, isto devido à presença da fibra que incrementou o teor de carboidratos. Este fato possivelmente também contribuiu para o maior extrato seco total observado na bebida com FOS.

Os teores de gordura das bebidas apesar de diferirem estatisticamente, estão abaixo de 0,5g/100g de produto, ou seja, podem ser classificadas como desnatadas, o que torna o produto atrativo do ponto de vista calórico. Em termos de proteínas totais as bebidas desenvolvidas demonstram que estes produtos obtidos a partir de uma mistura proporcional de leite fermentado e polpa de fruta contêm um teor protéico apropriado, em torno de 1,6%, o qual está inclusive acima do permitido na legislação brasileira para bebida láctea fermentada, de no mínimo 1,2g de proteína por 100 g de produto. Desta forma este produto pode ser considerado nutricionalmente adequado devido ao seu teor protéico, baixo teor de gordura e a possível presença de compostos funcionais naturalmente provenientes da goiaba vermelha, como o licopeno.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da viabilidade das bactérias probióticas após 1, 15 e 30 dias de estocagem refrigerada (4ºC).

Tabela 3 – Contagens de probióticos (log UFC/mL) nas bebidas com e sem FOS (n = 2), após 1, 15 e 30 dias de estocagem a 4ºC.

Período de estocagem (dias)	Bebida com 1,7% FOS	Bebida sem FOS
1	6,97	6,90
15	6,56	6,79
30	6,87	7,04

Observa-se na Tabela 3 que as contagens de probióticos (log UFC.mL^{-1}) para as bebidas desenvolvidas com e sem FOS apresentaram contagens similares entre as amostras e ao longo do período de armazenamento refrigerado. No entanto, ainda que seja possível observar pequena diferença nas contagens entre as amostras com e sem adição de fruto-oligossacarídeo, essa diferença provavelmente não proporciona nenhuma alteração no produto ou diferença fisiológica para o consumidor. Considerando os valores obtidos nos produtos, entre 10^6 a 10^7 UFC.mL^{-1}, um consumo diário mínimo de 100 mL ou 200 mL (porção regulamentada para fins de rotulagem nutricional) possibilita níveis de probióticos dentro do proposto pela legislação para alegação de propriedades funcionais.

A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é fundamental, necessitando alcançar populações suficientemente elevadas (tipicamente acima de 10^6 UFC/ml ou g) para ser de importância fisiológica ao consumidor (JELEN; LUTZ, 1998). O consumo de quantidades adequadas dos microrganismos probióticos é desejado nos bioprodutos (10^9 a 10^{10} UFC/100 g de produto) de forma a atingir quantidades suficientes para a manutenção das concentrações ativas

Tabela 2 – Análises físico-químicas das formulações de bebida com FOS e sem FOS, após um dia de fabricação.

Análises \ amostras	Bebida sem FOS	Bebida com 1,7% FOS	d.m.s. (5%)
pH	4,42^a	4,40^a	0,04
Acidez (g ácido lático/100g)	0,42^a	0,41^a	0,01
Proteína total (g/100g)	1,58^a	1,57^a	0,03
Gordura (g/100g)	0,26^a	0,20^b	0,06
EST* (g/100g)	15,71^b	16,06^a	0,21
Cinzas (g/100g)	0,48^a	0,47^a	0,01
CH totais** (g/100g)	13,40^b	13,81^a	0,24

EST* = extrato seco total, CH totais** = carboidratos totais, d.m.s. = diferença mínima significativa
Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância.

fisiologicamente (quantidade intestinal de 10^6 a 10^7 UFC/g) *in vivo* (CHARTERIS et al., 1998). Os alimentos devem permanecer com algumas características inalteradas após a adição do micro-organismo para serem considerados probióticos como, por exemplo, conter pelo menos 10^7 UFC/ g de bactérias probióticas viáveis no momento da compra do produto. Esta é uma concentração recomendada por alguns autores (RYBKA; FLEET, 1997; VINDEROLA; REINHEIMER, 2000). Vários autores propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica seja de 10^8 e 10^9 UFC, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g (LEE; SALMINEN, 1995; BLANCHETTE et al., 1996; HOIER et al., 1999). Portanto, de acordo com os dados obtidos neste estudo (Tabela 3), as bebidas com e sem FOS se mantiveram durante 30 dias de armazenamento sob refrigeração dentro dos níveis recomendados para o consumo de bactérias probióticas viáveis, ou seja, uma dose de 100 mL das bebidas garante a ingestão de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo.

Diversos estudos investigaram os efeitos do fruto-oligossacarídeos (FOS) no intestino humano. Em geral, a alimentação com FOS aumenta as concentrações de bifidobactérias, lactobacilos e SCFA (*short-chain fatty acids* ou ácidos graxos de cadeia curta) e diminui o pH, e número de *Clostridium*, fusobactérias e bacteróides. De acordo com Gibson et al. (1996) e Roberfroid (1996), as doses de FOS consideradas com efeito bifidogênico em humanos estão entre 4 e 15 g/dia. Nesse contexto, Buddington (1996) demonstrou que os oligossacarídeos da frutose são prebióticos em 4 g/dia. De acordo com Cho e Finocchiaro (2010) a contagem de bifidobactérias aumentou quando foram usadas 20 g/dia de lactulose ($P < 0,05$) e 15g/dia ($P < 0,01$) e 20 g/dia ($P < 0,05$) de inulina. Uma relação entre as dosagens foi demonstrada para o FOS (cadeia curta), mas não para outros substratos.

Os fruto-oligossacarídeos (cadeia curta) foram considerados bifidogênicos em doses que variam de 2,5 a 10 g/dia, e a inulina, em doses que variam entre 5 e 15 g/dia. Dados experimentais sugerem que a importância dos efeitos bifidogênicos do FOS (cadeia curta) e inulina podem estar relacionados ao tamanho de suas cadeias. Estudos *in vitro* reportaram uma diferença no perfil de fermentação de acordo com o comprimento da cadeia. Além disso, um estudo realizado em ratos mostrou que modificações no comprimento da cadeia do frutano podem modelar a composição da microbiota intestinal. Uma comparação aos pares entre o FOS (cadeia curta) e a inulina de cadeia longa foi realizada em um ensaio clínico aleatório incluindo 50 voluntários. A contagem de bifidobactéria cresceu em ambos o grupos ($P < 0,01$), mas os efeitos apareceram mais rapidamente no FOS de cadeia curta, provavelmente porque a fermentação foi mais lenta no grupo da inulina de cadeia longa (CHO & FINOCCHIARO, 2010).

Akalin, Fenderya e Akbulut (2004) avaliaram a viabilidade durante 28 dias a 4ºC de duas espécies de Bifidobactérias (*B. longum* e *B. animalis*) adicionadas ao iogurte com e sem FOS. A viabilidade foi afetada pelo tipo de estirpe e pela presença de FOS, sendo que a *B. animalis* apresentou melhor estabilidade que a *B. longum*, sendo que o maior número de bifidobactérias foi obtido com a adição de FOS. Estes resultados são condizentes com a literatura sobre a capacidade de FOS para estimular a viabilidade de bifidobactérias em leite em pó desnatado reconstituído durante quatro semanas de armazenamento refrigerado a 4ºC o FOS foi o mais efetivo prebiótico entre as fontes de carboidratos testados e o seu efeito aumentou com o aumento da concentração de carboidratos (máximo de 5%) (SHIN et al. 2000). Da mesma forma, a viabilidade de cepas de bifidobactérias em leite desnatado reconstituído foi significativamente maior durante 4 semanas de armazenamento ($P < 0,05$), quando foram inoculados na presença de prebióticos, em comparação com os controles sem qualquer prebiótico. A maior viabilidade foi encontrada em cepas de *B. longum* (Bb-3) e *B. animalis* (Bb-5) com Hi-maize (BRUNO; LANKAPUTHRA; SHAH, 2002). A estimulação de bifidobactérias no cólon humano por FOS também tem sido demonstrada em ensaios de alimentação humana (GIBSON; ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, 1996). Por outro lado, a influência do tipo de oligossacarídeos frutanos (como prebióticos) no crescimento e na atividade acidificante de cepas de *Bifidobacterium* foi estudada *in vitro*, usando meios de nutrição mínima. Os resultados mostraram que a maioria das espécies de bifidobactérias utilizam FOS, mas apenas dezoito de trinta cepas testadas (principalmente de *B. longum* e *B. animalis*) foram estimuladas (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002). A degradação de FOS por fructofuronasidases de bifidobactérias pode aumentar o crescimento e FOS de cadeia curta são fermentados mais rapidamente pelas bifidobactérias (PERRIN et al., 2002). Capela, Hay e Shah (2006) avaliaram o efeito dos prebióticos Hi-maize, Raftiline (inulina) e Raftilose P95 (FOS) sobre a viabilidade dos micro-organismos probióticos em iogurte e concluiram que a adição de 1,5% de Raftilose possibilitou melhor manutenção da viabilidade (8,7 log) durante 4 semanas de estocagem a 4ºC.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho em termos de viabilidade dos probióticos nas bebidas com e sem FOS, observou-se que as contagens mantiveram-se praticamente constantes em ambos os produtos (com e sem FOS) demonstrando que a fibra prebiótica não apresentou efeito sobre a viabilidade dos probióticos ao longo de 30 dias de estocagem a 4ºC, como reportado por outros autores.

Os probióticos mantiveram-se viáveis durante o período avaliado nas bebidas desenvolvidas com uma mistura de iogurte e polpa de goiaba (50/50), mesmo num pH desfavorável (≤4,4). Além disto, as contagens de probióticos durante a estocagem mantiveram-se dentro dos limites exigidos pela legislação brasileira; bem como o emprego de 1,7% de FOS possibilita a ingestão de 3,4 gramas de fibras na porção diária recomendada (200mL) o que atende a legislação para alegação de propriedades funcionais, portanto, esta bebida pode ser considerada como simbiótica.

4 CONCLUSÕES

A viabilidade da cultura probiótica nas bebidas probióticas, com e sem FOS, após 30 dias de estocagem refrigerada se manteve dentro do limite proposto pela legislação brasileira para alimentos com alegações de propriedades funcionais, com valores de 10^6 a 10^7 UFC.mL^{-1}, o que corresponde a 10^8 e 10^9 UFC para um consumo diário mínimo de produto de 100mL. Neste estudo a adição de 1,7% de FOS não aumentou a viabilidade das bifidobactérias. Contudo, o emprego de 1,7% de FOS possibilita a ingestão de 3,4 gramas de fibras na porção diária (200mL) o que atende a legislação para alegação de propriedades funcionais. A bebida desenvolvida neste trabalho com uma mistura de iogurte com probióticos, com e sem FOS, adicionada de polpa de goiaba (50/50) pode ser considerada como simbiótica.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa PIBIC, ao TECNOLAT pelo apoio na execução do trabalho. Às empresas, Kerry do Brasil pelos fermentos lácticos e BENEO-Orafti doação dos prebióticos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Alimentos**. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista das alegações aprovadas. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega .htm>. Acesso em: 28 ago. 2010.

AKALIN, A. S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 613-621, 2004.

AWAISHEH, S. S.; HADDADIN, M. S. Y.; ROBINSON, R. K. Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1184-1190, 2005.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v. 35, p.125-131, 2002.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S. F. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 79, p. 8-15, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. 2000. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, 10 jan. 2000. p. 54-58.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, n. 172, p. 8-22, 20 set. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos

lácteos. V – Métodos quantitativos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, DF, 14 dez. 2006.

BRUNO, F. A.; LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2740-2744, 2002.

BUDDINGTON, R. K. et al. Dietary supplementation of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 709-716, 1996.

BULLETIN OF THE IDF nº 411/2007 – Selective enumeration of bifidobacteria in dairy products: Development of a standard method.

CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of crytoprotectants, prebiotics and micro-encapsulation on survival of probiótico organisms in yogurt and freeze-dried yogurt. **Food Research International**, v. 39, p. 203-211, 2006.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 4, p. 123-136, 1998.

CHO S. S.; FINOCCHIARO, E. T. **Handbook of Prebiotics and Probiotics ingredients: Health benefits and food applications.** Boca Raton: CRC Press LLC, 2010. 435 p.

EVANGELISTA, R. M.; VIEITES, R. L. Avaliação da Qualidade de Polpa de Goiaba Congelada, Comercializada na Cidade de São Paulo. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, ano 2, v. 13, p. 76-81, 2006.

FAO/WHO. **Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.** London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

GALLINA, D. A. Leites Fermentados Funcionais – Tendências e Inovações. **Revista Ingredientes e Tecnologias**, Ano 3, n 9, p. 26-30, 2010.

GIBSON, G. R., ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R.; WILLEMS, A.; READING, S.; COLLINS, M. D. Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, p. 899-912, 1996.

GOLDBERG, I. **Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. Editora Cahpman & Hall, New York. 1994. 571p.

HORWITZ, W., ed. **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 17th Ed., 2000, Vol. II. Food Composition; Additives; Natural Contaminants, chap 33, p.10; 54; 61; 71. (Proc. 920.108; 930.30; 935.42 and 945.46).

HOIER, E. et al. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: LAW, B. A., ed. **Technology of Cheesemaking**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 99-131.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of the total nitrogen content of milk by Kjeldahl method.** Brussels: FIL/IDF, 1993. 11p.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G., ed. **Functional foods: biochemical and processing aspects.** Lancaster: Technomic Publishing, 1998. p. 357-381.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 6, p. 241-245, 1995.

MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 173-182, 2002.

OLIVEIRA, J. S. de. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. Campinas: UNICAMP, 1986. 146p.

PAQUIN P. **Functional and speciality beverage technology**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2009. 500 p.

PERRIN, S. et al. Fermentation of chicory fructo-oligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerization by three strains of bifidobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 759-763, 2002.

PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic

beverage. **Food Research International**, v. 41, p. 111-123, 2008.

ROBERFROID, M. B. Functional effects of foods components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. **Nutrition Reviews**, v. 54, p. S38-S42. 1996.

RYBKA, S.; FLEET, G. H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium species* in Australian yoghurts. **Food Australian**, Sydney, v. 49, n. 10, p. 471-475, 1997.

SHIN, H. S. et al. Growth and viability of ommercial Bifidobacterium spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 884–887. 2000.

SPILLER, G. A. CRC **Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition**. CRC Press. 3ª edição. ISBN 0849323878, 9780849323874. 2001. 709 p.

TECHNICAL BULLETIN P –12. **Alternative method for enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products.** – Guidelines. Chr-Hansen, 2007.

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, nº 3, p. 589-595, jul-set. 2006.

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