



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**AValiação de Polpas de Frutas, Probióticos e Prebióticos para  
Aplicação em Bebida Simbiótica Elaborada com Leite Fermentado**

Rafaela F. **Gatti**<sup>3a</sup>; Darlila A. **Gallina**<sup>1b</sup>; Fabiana K. H. S. **Trento**<sup>1c</sup>;  
Rita C. S. **Ormenese**<sup>2c</sup>, Aline **Garcia**<sup>2c</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Tecnologia de Alimentos, TecnoLat; <sup>2</sup> Instituto de Tecnologia de Alimentos, CCQA; <sup>3</sup> Faculdade de Engenharia de Alimentos, FAJ

**Nº 13202**

**RESUMO** – Este projeto teve como objetivo avaliar diferentes polpas de frutas, probióticos e prebióticos na elaboração de uma bebida simbiótica obtida a partir de leite fermentado adicionado de polpa de frutas. Inicialmente foram avaliadas diferentes polpas de frutas para aplicação na bebida sendo elaboradas 36 formulações com leite fermentado e polpas de frutas, nas concentrações (60/40; 55/45 e 50/50) (m/m). Seis formulações foram selecionadas sensorialmente empregando-se as polpas de manga, uva, frutas vermelhas (8 e 10% açúcar), manga/maracujá, frutas vermelhas/acaí, e leite fermentado, na proporção (40/60) respectivamente, sendo avaliadas quanto a contagem das bifidobactérias e ao teste de aceitação e preferência. A formulação com a polpa de frutas vermelhas (10% açúcar) foi a escolhida pela avaliação sensorial e pela viabilidade dos probióticos na bebida. Foram empregadas três culturas probióticas comerciais, as fibras inulina e fruto-oligossacarídeo e a polpa de frutas vermelhas para elaboração de seis bebidas tipo smoothie com leite fermentado e polpa de frutas (60/40). Todas as formulações apresentaram níveis de probióticos atendendo a legislação para alimento funcional. Porém o probiótico que apresentou melhor desempenho foi o Howaru Bifido (*Lactis HN 019*) mantendo um nível de 7-8 log UFC.mL<sup>-1</sup> durante 40 dias sob refrigeração. Em algumas formulações a inulina proporcionou um efeito prebiótico superior ao FOS, no entanto com 40 dias não se observou diferença na viabilidade dos micro-organismos com ambas as fibras. A acidez titulável e o pH das bebidas aumentou durante a estocagem o que é característico devido a produção de compostos ácidos.

**Palavras-chaves:** iogurte, fibras, bifidobactérias, polpa de frutas, viabilidade.

<sup>a</sup> Bolsista CNPq; Graduação em Engenharia de Alimentos, rafaela.gatti@hotmail.com, <sup>b</sup> Orientador, <sup>c</sup> Colaborador



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**ABSTRACT-** *This project aimed to evaluate different fruit pulps, probiotics and prebiotics in development of a synbiotic beverage obtained from fermented milk with fruit pulp. First at all it was evaluated different fruit pulps for use in the beverage. 36 formulations was prepared with fermented milk and fruit pulp in the concentrations (60/40, 55/45 and 50/50) (m / m). Six formulations were selected employing pulps of mango, grape, berries (8 and 10% sugar), mango / passion fruit, berries / acai, and fermented milk, in the proportion (40/60) respectively, and evaluated the counts of bifidobacteria and tests of acceptance and preference. The formulation with the pulp of red fruits (10% sugar) was chosen by the sensory evaluation and viability of probiotics in the drink. It were used three probiotic commercial cultures, the fibers inulin and fructo-oligosaccharide and red fruits pulp to prepare six smoothie type beverages with fermented milk and fruit pulp (60/40). The six formulations showed levels of probiotics according to legislation of functional food. The probiotic who performed better was the Howaru Bifido (lactis HN 019) maintaining a level of 7-8 log UFC.mL<sup>-1</sup> for 40 days under refrigeration. In some formulations, the inulin provided a better prebiotic effect than the FOS, however with 40 days there was no difference in the viability of microorganisms with both fibers. The titratable acidity and pH of the beverages increased during storage, which is characteristic due to production of acidic compounds.*

**Key-words:** yogurt, fibers, bifidobacterium ssp., fruit pulp, viability.

### Introdução

Pesquisas têm demonstrado que os consumidores estão atentos à composição dos produtos alimentícios e buscam cada vez mais alimentos com características de saudabilidade; neste foco destaca-se a demanda por alimentos funcionais. A indústria de alimentos está atenta e em busca por novas tecnologias para a elaboração de produtos novos e com alto valor agregado. As fibras solúveis podem servir seletivamente como substrato para micro-organismos como os probióticos, podendo auxiliar no funcionamento do intestino. Diversos estudos apontam para a influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana. 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. “Smoothie” é uma bebida feita com suco de fruta, refrescante e menos calórica, com aparência semelhante ao de “milkshakes”, porém, originalmente criada sem adição de leite. A fusão de produtos lácteos e bebidas de frutas marca a introdução de “juiceceuticals” como bebidas de iogurte e frutas que são exemplos típicos de produtos lácteos híbridos oferecendo saúde, sabor e conveniência (KRUPA et al., 2011). A viabilidade e a estabilidade de culturas probióticas têm sido um desafio tecnológico para as indústrias processadoras. Alimentos probióticos devem conter



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

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 (GALLINA et al., 2012).

Este projeto objetivou avaliar diferentes polpas de frutas, probióticos e prebióticos para a elaboração de uma bebida simbiótica obtida a partir de leite fermentado adicionado de polpa de frutas, visando atender a demanda do consumidor por alimentos mais saudáveis.

### 1 MATERIAL E MÉTODOS:

#### Material

Culturas probióticas (*Bifidobacterium ssp.*): Kit Bifi CSL, Howaru Bífido (lactis HN 019), Lafti B94 (lactis Lafti); cultura termofílica: Jointec X3 –CSL, YO-MIX 863 LYO (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*); leite em pó desnatado (Molico – Nestlé) e leite pasteurizado desnatado tipo A; polpa de frutas pasteurizadas (DeMarchi); sacarose (açúcar união); inulina (Orafti GR) e fruto-oligossacarídeo (Orafti P95).

#### Métodos

##### 2.1. Seleção das polpas de frutas e da concentração leite fermentado/polpa de frutas.

Para elaboração do leite fermentado foi utilizado leite em pó desnatado reconstituído (12%) e 8% de sacarose. Esta mistura base foi tratada termicamente por 85°C por 20-30 minutos em banho termostizado, resfriada e adicionada da cultura termofílica (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*). Efetuou-se a fermentação na temperatura de 42°C até pH 4,7±0,1. Após a fermentação, o iogurte foi adicionado de polpas de frutas pasteurizadas, nas combinações de 60/40, 55/45 e 50/50 (v/v) (iogurte/polpa de frutas) para obtenção da bebida tipo smoothie. Uma quantidade adicional de sacarose foi acrescentada, totalizando 8% de açúcar no produto final. As amostras foram estocadas em câmara fria a 10±2°C. As polpas de acerola, manga, amora, morango, framboesa, cacau, açaí, frutas vermelhas, maracujá, abacaxi, uva, foram empregadas, separadamente e em combinações, totalizando 36 formulações, as quais foram submetidas à avaliação sensorial consensual por uma equipe treinada que selecionou seis formulações e a combinação mais apropriada de leite fermentado/polpa de frutas (60/40).

Para a elaboração das seis formulações preparou-se o leite fermentado a partir de leite desnatado reconstituído (12%) adicionado de sacarose (8%), empregando-se a cultura termofílica de iogurte (Jointec X3) e a cultura probiótica (Bifidobactérias ssp. – Kit Bifi). A fermentação foi



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

conduzida em estufa controlada (BOD) na temperatura de 44°C até pH 4,7±0,1. Após a fermentação, o iogurte foi adicionado das polpas de frutas pasteurizadas (manga, uva, manga/maracujá, frutas vermelhas (8 e 10% de açúcar), frutas vermelhas/açaí), na concentração de 60/40 (m/m) para obtenção das bebidas. Uma quantidade adicional de sacarose foi acrescentada ao leite fermentado totalizando 8% de açúcar no produto final, além de sorbato de potássio (0,03%). As amostras obtidas foram estocadas em câmara fria a 8±2°C e avaliadas após 1 dia de fabricação por meio de análises microbiológicas (coliformes a 30-35°C e 45°C e bolores e leveduras) e com 1, 15 e 30 dias quanto as contagens das bactérias probióticas (Bifidobactérias). Após 7-10 dias de fabricação as formulações foram submetidas ao teste de aceitação e preferência. Tendo em vista as avaliações sensoriais e a viabilidade dos probióticos nas bebidas elaboradas selecionou-se a polpa de frutas vermelhas para os estudos com os probióticos e as fibras.

### 2.2. Estudo da viabilidade das bactérias probióticas e avaliação dos prebióticos

Leite em pó desnatado reconstituído (12%) adicionado de 8% de sacarose e 4% de fibra (inulina ou fruto-oligossacarídeo) foi tratado à 85°C por 20-30 minutos, resfriado (42°C) e adicionado das culturas termofílicas (*L. bulgaricus* e *S. thermophilus*) e de diferentes culturas probióticas comerciais. A fermentação foi conduzida na temperatura de 42°C até pH 4,7±0,1. O leite fermentado foi adicionado de polpa de fruta pasteurizada (40%) e 0,03% de sorbato de potássio. Uma quantidade adicional de sacarose (diluída em água e tratada termicamente) foi adicionada a mistura (leite fermentado e polpa), totalizando 10% de açúcar no produto final. As amostras obtidas foram estocadas em câmara fria a 10±2°C.

Desta forma, foram empregadas três culturas probióticas comerciais, as fibras inulina e fruto-oligossacarídeo e a polpa de frutas vermelhas para elaboração de seis bebidas tipo smoothie com leite fermentado e a polpa de frutas (60/40), totalizando 6 formulações as quais foram avaliadas com um dia de fabricação quanto a qualidade higiênico-sanitária por meio de análises microbiológicas (coliformes a 30-35°C e 45°C e bolores e leveduras), viabilidade da cultura probiótica, pH e acidez titulável. Nos dias 10, 20, 30 e 40 avaliou-se a viabilidade da cultura probiótica, pH e acidez titulável. A composição físico-química (pH, acidez titulável, extrato seco total, gordura, proteína total, cinzas e carboidratos totais) da formulação que apresentou melhor viabilidade da cultura probiótica também foi determinada.



### **2.3. Determinações analíticas**

#### **2.3.1. Avaliação sensorial consensual por equipe de julgadores selecionados**

As 36 formulações das bebidas foram avaliadas por uma equipe composta por 6 julgadores selecionados quanto à acuidade sensorial de acordo com a Norma ISO-8586-1 (1993). As características sensoriais de aparência, odor, sabor e textura/sensação na boca e qualidade global das amostras foram avaliadas com o emprego de uma escala linear estruturada de 10 cm para quantificar as intensidades das características percebidas, onde os valores, 0, 5 e 10 correspondem à inexistente/muito fraco, moderado e muito forte, respectivamente. No final da avaliação de cada amostra, a equipe descreveu de forma consensual a qualidade global com o emprego de uma escala linear estruturada de 10 cm (0 = péssimo, 1 = muito ruim, 3 = ruim, 5 = regular, 7 = bom, 9 = muito bom e 10 = excelente). Seis formulações que apresentaram maior nota na escala utilizada foram selecionadas para os testes de aceitação e preferência.

#### **2.3.2. Teste de aceitação e Preferência**

Sessenta provadores que costumam consumir sucos de frutas e iogurte, sem restrições quanto à idade, sexo, frequência de consumo, das classes sociais A/B/C avaliaram seis amostras de bebidas tipo smoothie quanto à aceitabilidade de modo global e em particular da aparência, aroma e sabor por meio de escalas hedônicas de nove pontos (9=gostei muitíssimo, 5=não gostei nem desgostei e 1= desgostei muitíssimo) (MEILGAARD et al., 2006), quanto à intensidade ideal do sabor de leite fermentado, do sabor de fruta, do adoçamento e da consistência por meio de escalas de cinco pontos (5=muito mais intenso/doce/consistente do que eu gosto 3=do jeito que eu gosto 1=muito menos intenso/doce/consistente do que eu gosto). As amostras foram servidas na quantidade de 40 mL em copos descartáveis de cor branca, na temperatura de aproximadamente 12°C. As amostras foram avaliadas de forma monádica seqüencial, segundo um delineamento de blocos completos casualizados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Para avaliação da preferência das amostras foi realizado um teste de ordenação onde os provadores (60) ordenaram as amostras da mais preferida para a menos preferida. Os resultados relativos à soma das posições de ordenação foram avaliados pelo Teste de Friedman e Teste de Fischer.

#### **2.3.3. Análises Microbiológicas**



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

A contagem seletiva dos micro-organismos probióticos (*Bifidobacterium* subsp.) foi realizada de acordo com a metodologia do Boletim Técnico da Chr-Hansen (Technical Bulletin P-12, 2007), com adaptações, empregando-se Agar MRS, cloreto de lítio, dicloxacilina e L-cisteína, com incubação a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  em anaerobiose por  $72\pm 3$  horas.

A determinação de coliformes a  $30\text{-}35^\circ\text{C}$  foi realizada a por meio do procedimento dos tubos múltiplos ou número mais provável (NMP) e os coliformes termotolerantes a  $45^\circ\text{C}$  em Caldo Laurilsulfato avaliado-se à fluorescência em luz ultravioleta, de acordo com Wehr & Frank (2004). Os bolores e leveduras foram determinados em Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol com incubação por 5 dias a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  (WEHR & FRANK, 2004).

### 2.3.4. Análises Físico-químicas

O pH, teor de acidez titulável, extrato seco total e gordura 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 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:

$$\text{Carboidratos totais} = [100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ gordura})].$$

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Trinta e seis formulações de bebida tipo “smoothie” foram avaliadas por uma equipe consensual, onde se selecionou as combinações mais agradáveis sensorialmente, as quais foram elaboradas com as polpas de manga, uva, manga/maracujá, frutas vermelhas (8 e 10% de açúcar), frutas vermelhas/açaí, na concentração de 60/40 (m/m) de leite fermentado e polpa de frutas e avaliadas quanto a aceitação e preferência. Quanto à aceitabilidade de modo global e em particular da aparência, aroma, sabor, as amostras contendo as polpas de Manga, Uva, Manga/Maracujá e Frutas vermelhas 10% apresentaram médias entre “gostei” e “gostei muito” e foram as mais aceitas. As amostras contendo Manga, Manga/Maracujá e Frutas vermelhas 10% foram às preferidas no teste de ordenação em relação às demais.

As contagens de coliformes ( $30\text{-}35^\circ\text{C}$  e  $45^\circ\text{C}$ ), bolores e leveduras e bactérias lácticas viáveis estão de acordo com os limites estipulados pela legislação (BRASIL, 2001) para leites fermentados, com ou sem adições, refrigerado. A viabilidade da cultura probiótica nas bebidas ao longo da estocagem se manteve em torno de 6 a 7 log de UFC/mL, exceto para formulação com



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

polpa de manga, a qual foi inferior. Dentre as seis formulações avaliadas selecionou-se a polpa de frutas vermelhas (com 10% de açúcar), tendo em vista os resultados da viabilidade dos probióticos e a aceitação e preferência sensorial.

Avaliando-se a qualidade microbiológica das seis formulações desenvolvidas (3 probióticos, 2 fibras, polpa de frutas vermelhas), verificou-se contagens de coliformes 30-35°C/45°C inferior a 0,3 NMP/mL; quanto aos bolores e leveduras as contagens foram relativamente altas, constatando-se que foi proveniente da polpa de frutas. Apesar da polpa de frutas ser pasteurizada, ressalta-se a importância de verificar a qualidade microbiológica da mesma antes da sua aplicação, e caso seja necessário deve-se realizar um tratamento térmico adicional a fim de garantir a qualidade do produto elaborado.

Na Tabela 1 estão expressos os resultados da viabilidade dos probióticos nas bebidas com leite fermentado e a polpa de frutas vermelhas (60/40), durante o período de estocagem.

**Tabela 1.** Contagem dos micro-organismos *Bifidobacterium* subsp. (log UFC.mL<sup>-1</sup>) nas seis formulações elaboradas

Bebida (LF* + polpa FV**)	Período de estocagem (dias)				
	1	10	20	30	40
F1 (HOWARU/INU)	8,67	8,68	8,70	8,20	7,71
F2 (HOWARU/FOS)	8,66	8,57	8,33	7,71	7,60
F3 (LACTIS/INU)	7,65	7,45	7,31	7,71	6,64
F4 (LACTIS/FOS)	7,26	7,21	6,81	6,74	6,35
F5 (KIT BIFI/INU)	7,86	7,60	7,44	7,23	6,73
F6 (KIT BIFI/FOS)	7,43	7,33	7,25	7,14	6,81

LF\* = leite fermentado, FV\*\* = frutas vermelhas.

Em relação à viabilidade da cultura probiótica nas bebidas na estocagem (Tabela 1), os resultados estão entre 6-8 log de UFC/mL, portanto, de acordo com a legislação vigente para alimentos funcionais, que estabelece uma quantidade mínima viável para os probióticos na faixa de 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> (UFC) na recomendação diária do produto pronto para consumo, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> UFC/ mL ou g (ANVISA, 2008).

Em relação ao pH e acidez das seis formulações, verificou-se um decréscimo no pH (em média de 4,2 com 1 dia para 3,75 com 40 dias) e um acréscimo na acidez, de 0,73 para 0,95 g ácido láctico/100g de produto, durante a estocagem. Isto normalmente ocorre em produtos lácteos fermentados devido à produção de ácidos orgânicos pelas bactérias lácticas.

A formulação F1 (n=2) obtida com probiótico (Howaru HN 019), inulina e polpa de frutas vermelhas apresentou a seguinte composição físico-química: pH de 4,33; acidez titulável de 0,7642



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

g ácido láctico por 100 gramas; extrato seco total de 19,3525%; gordura total de 0,2312%; proteína total de 2,0410%; cinzas de 0,6735% e carboidratos totais de 16,4068%.

### 4 CONCLUSÃO

Todas as formulações apresentaram níveis de probióticos atendendo a legislação para alimento funcional. O probiótico que apresentou melhor desempenho foi o Howaru Bifido (lactis HN 019) mantendo um nível de 7-8 log UFC.mL<sup>-1</sup> durante 40 dias sob refrigeração. As fibras inulina e FOS não apresentaram diferença quanto à atividade prebiótica durante 40 dias à 10°C.

### 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa e financiamento do projeto.

### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ANVISA, 2008. Comissões Tecnocientíficas de Acessoramento 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](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em: 28/08/2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa 68 de 12/12/2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. V - Métodos quantitativos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 10 jan. 2001.

HORWITZ, W., ed. Official Methods of Analysis of AOAC International 17<sup>th</sup> 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 ).

GALLINA, D. A.; ANTUNES, A. E. C.; AZAMBUJA-FERREIRA, N. C.; MENDONÇA, J. B.; NORBONA, R. A. Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação da viabilidade das bifidobactérias. *Rev. Instituto Lat. Cândido Tostes*, nº 386, v. 67, p. 45-54, 2012.

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

INTERNATIONAL STANDARD. ISO 8565-1. **Sensory analysis - General guidance for selection, training and monitoring of assessors** - Part 1: Selected assessors. Geneva: International Organization for Standardization, 1993.

KRUPA, H.; JANA ATANU, H.; PATEL, H. *African Journal of Food Science*. Vol. 5, nº 16, pp. 817-832, 2011.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. *Sensory evaluation techniques*. 4th edition, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 2006. 448p.

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

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. *Standard Methods for the examination of Dairy Products*. 17<sup>th</sup> edition. APHA-American Public Health Association. Washington, EUA. 2004. 570 p.