

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE ÁGUA NA SOBREVIVÊNCIA DE PROBIÓTICO EM MATRIZ DE FRUTA

Grazielly Rodrigues Silva ¹; Sérgio Roberto Mendes da Costa ²; Cynthia Jurkiewicz Kunigk ³

¹ Aluno de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

² Aluno de Mestrado da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

³ Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *A crescente busca por alimentos funcionais vem criando desafios para as indústrias alimentícias. As frutas, por serem fontes de vitaminas e sais minerais, entre as quais, a ameixa, podem ser consideradas bons ingredientes para o desenvolvimento de alimentos funcionais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* em uma matriz de ameixa, com diferentes valores de atividade de água. A matriz de fruta foi produzida com ameixa seca, sacarose, xarope de glicose, água e pectina. O ajuste da atividade de água (A_w) entre 0,60 e 0,90 foi obtido pela variação nos teores de sacarose e água. A cultura probiótica liofilizada, previamente ativada em caldo MRS, foi adicionada na matriz de ameixa de forma a obter uma contagem inicial de 10^8 UFC/g. A mistura foi fracionada, embalada a vácuo e armazenada a 4°C durante 42 dias. No produto com A_w de 0,61, a contagem do probiótico apresentou redução de 0,8 Log UFC/g em 21 dias, enquanto na matriz com A_w de 0,84, a contagem reduziu em 4,6 Log UFC/g no mesmo período. A matriz de fruta com baixa atividade de água, próximo a 0,60, mostrou ser uma boa alternativa para o desenvolvimento alimentos probióticos.*

Introdução

O conceito de nutrição está evoluindo, hoje, a dieta não deve ser somente entendida como suficiente para evitar déficits de nutrientes, mas também deve ser vista como uma nutrição que objetiva a qualidade de vida. A alimentação ganha um enfoque terapêutico e preventivo, atuando na promoção da saúde (Angelis, 2001; Silveira-Rodriguez et al., 2003).

Partindo do ponto que, alimento não só tem a função de nutrir como também de fornecer outros benefícios ao indivíduo, temos o conceito de alimentos funcionais, que surgiu no Japão durante a década de 1980. Segundo a portaria nacional nº 398 de 1999 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, a definição para alimento funcional é: “todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo, sem supervisão médica” (Pimentel et al., 2005).

Há mudanças de conceito em relação ao que está sendo ingerido atualmente, a população tem buscado cada vez mais informações e produtos classificados como funcionais devido a imagem positiva relacionando essa classe de alimentos à melhoria na saúde e bem-estar. Para fundamentar os benefícios gerados por alimentos funcionais, hoje são feitas pesquisas científicas que contribuem para que a indústria alimentícia possa desenvolver novos produtos.

Dentre os grupos de alimentos que proporcionam benefícios ao organismo humano estão os alimentos probióticos, que são caracterizados pela adição de microrganismos vivos que promovem o equilíbrio da microbiota intestinal, atuando no organismo do hospedeiro de forma benéfica. Dentre os principais benefícios atribuídos ao consumo de determinadas linhagens de probióticos, pode-se destacar: favorecer o equilíbrio da microbiota intestinal, potencializar a imunidade, e aumentar a biodisponibilidade de certos nutrientes. Para que haja a ação desejada, é essencial que os probióticos sejam ingeridos diariamente e em quantidades expressivas, além disso, devem permanecer vivos durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Por essa razão, estudos sugerem que o alimento probiótico tenha uma

contagem entre 10^6 a 10^7 UFC/g, o que representa o consumo de 10^8 a 10^9 na porção diária (Walson e Preesy, 2016).

As frutas, por serem fontes de vitaminas e sais minerais, podem ser consideradas bons ingredientes para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

As ameixas secas são frutos desidratados da espécie *Prunus domestica*, pertencente ao gênero *Prunus* da família *Rosaceae*. Contém quantidades de potássio, fibras dietéticas e minerais que auxiliam na movimentação gastrointestinal, reduzindo os sintomas de cólicas intestinais e prisão de ventre (Jungles, 2013).

Unindo os benefícios da ameixa aos do microrganismo probiótico, resulta em um novo alimento funcional à base de frutas.

De forma a contribuir com o desenvolvimento de alimentos funcionais à base de frutas, como geleia ou barra de frutas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência de bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em uma matriz de ameixa, com diferentes valores de atividade de água.

Material e Métodos

Preparo das matrizes de ameixa

Foram produzidas cinco formulações de matrizes de ameixa, de acordo com Ponchio et al. (2017) com modificações, de forma a obter produtos com atividade de água variando entre 0,60 a 0,92 (Tabela 1).

Tabela 1- Formulações das matrizes de ameixa

Ingredientes (%)	Formulação				
	1	2	3	4	5
Ameixa seca	58,4	58,4	58,4	58,4	58,4
Sacarose	35,2	29,9	24,9	14,9	0,00
Xarope de glicose	4,90	4,90	4,90	4,90	4,90
Água	0,00	5,30	10,3	20,3	35,2
Solução 20 % CaCl ₂	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Pectina BTM	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Para o preparo das matrizes de fruta, primeiramente foi adicionada a ameixa seca sem caroço de origem Argentina (Argensun®) e 25% da sacarose (UNIÃO) no equipamento Thermomix (VORWERK) e a mistura homogeneizada por 2,5 minutos, na velocidade 4 (1100 rpm) a 37°C. Logo depois, o xarope de glicose (Karo) foi adicionado e homogeneizado por 2 minutos, na velocidade 4 a 50°C. Em seguida, foram adicionados, o restante da sacarose, a solução de cloreto de cálcio e a pectina (Danisco) e a mistura homogeneizada por 6,5 minutos, na velocidade 4 a 70°C, mantendo a tampa superior aberta, para que a água evaporada durante o processo não condensasse sobre a matriz de ameixa.

Preparo da cultura probiótica

Foi adicionado 0,1 g de cultura liofilizada de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Chr. Hansen) em 100 mL de solução salina 0,85% e homogeneizado no equipamento Stomacher (Seward) por 1 minuto, à 260 rpm. Em seguida, 1 mL da suspensão foi adicionada em 100 mL de caldo MRS (Oxoid) contendo 0,5% de solução de cisteína a 10%, e incubada à 37°C durante 20 horas. O caldo foi centrifugado (Mega 21R, Hanil) por 15 minutos, à 6000 rpm e 4°C. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionada solução salina para lavagem das células e novamente centrifugado por 15 minutos, à 6000 rpm e 4°C. Por fim, as bactérias foram suspensas em 4,2 mL de solução salina e adicionadas diretamente na matriz de fruta.

Adição do microrganismo à matriz de fruta

Para a incorporação do microrganismo, 1,0 % da suspensão da bactéria foi adicionada à matriz de ameixa e homogeneizada com o auxílio de uma espátula estéril. A mistura foi fracionada em porções de cerca de 29 gramas e embalada em sacos de polipropileno a vácuo e armazenada à 5°C.

Análise microbiológica

Amostras de 10 g da matriz de ameixa foram diluídas em 90 g de solução salina 0,85% e homogeneizada em Stomacher por 10 minutos à 260 rpm. Após a homogeneização, diluições decimais seriadas foram feitas, transferindo-se 1,0 mL de amostra diluída para 9,0 mL de solução salina. As amostras diluídas foram inoculadas em agar MRS (Oxoid) contendo 0,5% de cisteína a 10%, e incubadas em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) por 72 horas, à 37°C.

Análises físico-químicas

Foram realizadas as análises de pH, atividade de água (Aw) e umidade.

Para determinar o pH, uma amostra de 10 g de matriz de ameixa, juntamente com 100 mL de água destilada, foi triturada em Mixer (ProMix 400W – Philips Valita) por 1 minuto e o pH aferido em pHmetro (FiveEasy – Mettler Toledo).

A determinação da atividade de água das matrizes de ameixa foi realizado em equipamento Aqualab (Decagon Devices Inc) em triplicata para cada amostra..

Para a determinação da umidade, amostras de 5,0 g foram secas em estufa (TE 393/2-TECNAL) a 105°C, de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985), capítulo 13.3 (4.5.1).

Planejamento experimental e análise estatística

A variável dependente do planejamento experimental foi a atividade de água da matriz de ameixa, que foi estudada em cinco níveis (de 0,61 a 0,92). Como variável resposta foi determinada a contagem de *Bifidobacterium animalis* BB-12 durante 42 dias de armazenamento a 5°C. Todo o planejamento foi realizado em duplicata. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5 %.

Resultados e Discussões

Os valores de pH e de Aw das matrizes de ameixa após a adição do probiótico estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que as diferentes formulações levaram a obtenção de matrizes de ameixa com Aw variando entre 0,61 e 0,92, e um pH fixo de 4,0, de acordo com a proposta do trabalho. A umidade variou de 19,2 %, para a formulação com menor Aw, a 51,9 para a formulação com maior Aw.

Tabela 2 - Valores de pH, Aw e umidade das matrizes de ameixa com probiótico

Formulação	pH	Aw	Umidade %
1	4,0 ± 0,01	0,61 ± 0,01	19,2 ± 0,03
2	4,0 ± 0,01	0,70 ± 0,01	23,8 ± 0,05
3	4,0 ± 0,01	0,76 ± 0,01	27 ± 1
4	4,0 ± 0,01	0,84 ± 0,01	36,9 ± 0,3
5	4,0 ± 0,01	0,92 ± 0,01	51,9 ± 0,7

As contagens de *Bifidobacterium animalis* nas matrizes de ameixa com diferentes valores de atividade de água durante o armazenamento a 5 °C, expressas em Log UFC/g, estão apresentadas na Tabela 3 e Figura 1.

Tabela 3 - Contagem de *B. animalis* durante o armazenamento

Tempo(dias)	Formulações (Log UFC/g)				
	1	2	3	4	5
0	7,5 ^A ± 1,0	7,3 ^A ± 1,1	7,3 ^A ± 1,0	7,3 ^A ± 0,8	7,7 ^A ± 0,7
7	6,8 ^A ± 0,9	6,6 ^A ± 1,2	6,1 ^A ± 1,6	5,5 ^A ± 1,9	6,5 ^A ± 1,1
14	6,6 ^A ± 0,9	5,9 ^A ± 1,3	5,3 ^A ± 1,5	4,0 ^A ± 1,8	5,6 ^A ± 1,0
21	6,5 ^A ± 1,0	5,6 ^A ± 1,7	4,7 ^{AB} ± 2,2	2,7 ^B ± 3,8	3,7 ^{AB} ± 1,5
28	6,1 ^A ± 1,2	4,7 ^{AB} ± 2,2	2,6 ^{BC} ± 2,0	1,1 ^C ± 0,0	3,3 ^{ABC} ± 1,5
35	5,8 ^A ± 0,7	2,9 ^B ± 1,5	1,0 ^B ± 1,4	1,0 ^B ± 0,0	2,1 ^B ± 1,0
42	5,6 ^A ± 0,6	0,4 ^B ± 0,5	0,7 ^B ± 1,0	< 10 ^B	< 10 ^B

A, B, C – Médias que compartilham letras iguais na mesma linha ($p > 0,05$) não diferem significativamente.

Ao serem comparados os valores das contagens da bactéria probiótica nas matrizes com diferentes valores de atividade de água (Tabela 3), foi possível observar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) até o 14º dia de análise. A partir do 21º dia, a atividade de água passou a influenciar significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência do microrganismo. Em 21 dias de armazenamento, a redução no número de probióticos na matriz com Aw de 0,61 foi de 1,0 Log UFC/g, enquanto na matriz com Aw de 0,84, a redução foi de 4,6 Log UFC/g. Ao final dos 42 dias de armazenamento, não foi mais possível detectar a presença do probiótico nas matrizes com Aw de 0,84 e 0,92, e contagens muito baixas foram verificadas nas matrizes com Aw de 0,70 e 0,76, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre médias para essas formulações. Por outro lado, na matriz com Aw de 0,61 a contagem de *B. animalis* ao final de 42 dias de armazenamento, ainda era maior que 10⁵ UFC/g, muito superior ao verificado nas demais formulações.

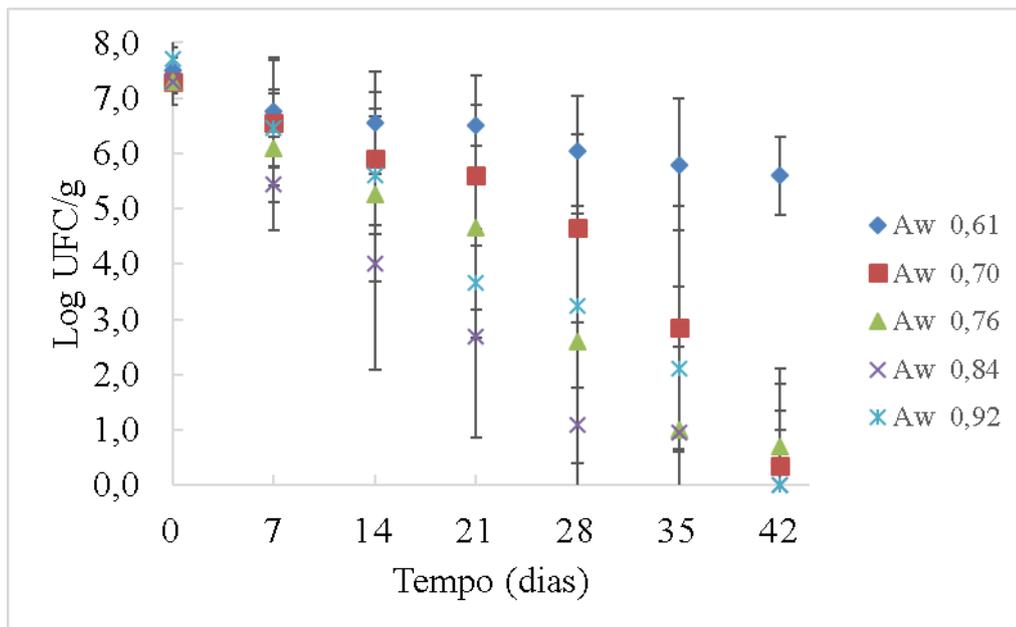


Figura 1- Contagem de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* em matriz de ameixa em diferentes valores de atividade de água, armazenados a vácuo durante 42 dias à 5°C.

Na Figura 1, pode-se também observar o decréscimo na contagem de *B. animalis* durante o período estudado, assim como a diferença no perfil de sobrevivência nas matrizes com atividade de água de 0,70, 0,76, 0,84, 0,92 em relação ao produto com Aw de 0,61.

De acordo com a literatura, para o alimento ser considerado probiótico é necessário que a contagem atinja um valor maior ou igual de 10^6 UFC/g para que o número de probióticos ingeridos na porção diária seja maior que 10^8 UFC (Oliveira et al., 2002). Para a matriz de ameixa é possível considerar uma porção de 30 g no caso de uma barra de fruta, assim o número de probióticos no produto deveria ser próximo de 10^7 UFC/g. A formulação com Aw de 0,61 foi a única que apresentou contagem próxima a 10^7 até o vigésimo primeiro dia de armazenamento, portanto podendo ser considerada probiótica até esta data. Já as matrizes com Aw 0,70 e 0,92 poderiam ser consideradas probióticas somente até o sétimo dia de armazenamento, enquanto as formulações com Aw de 0,76 e 0,84 apresentaram valores abaixo desse limite já na primeira semana.

Em 42 dias de armazenamento o decréscimo na contagem de *B. animalis* na matriz de ameixa com Aw de 0,61 foi de 2 Log UFC/g. Assim, se um número maior do probiótico fosse adicionado a matriz de ameixa, de forma a aumentar contagem inicial para 10^9 UFC/g, a vida de prateleira do produto poderia ser estendida para 42 dias.

Além do aumento da contagem inicial no produto, a encapsulação do microrganismo poderia aumentar a viabilidade da bactéria probiótica na matriz de fruta (Ponchio et al., 2017).

Conclusões

O estudo realizado mostrou que a atividade de água de uma matriz de fruta influencia de forma decisiva a sobrevivência do microrganismo probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12.

A formulação com atividade de água 0,61 apresenta potencial como veículo de bactérias probióticas, podendo contribuir para que novos alimentos probióticos não lácteos possam ser desenvolvidos.

Referências Bibliográficas

Angelis, R. C. (2001) Novos conceitos em nutrição: Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. São Paulo. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ag/v38n4/14265.pdf>.

- Grumezescu, A. M.; Holban, A. M. (2018). *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods*. Londres: Academic Press.
- Jungles, T. M. C. (2013) Caracterização da Estrutura Química e Avaliação da Atividade Antiúlcera de Polissacarídeos Extraídos da Ameixa Seca (*Prunus domestica*). *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba*, 91.
- Matias, S. N. (2011) Desenvolvimento de alimento probiótico à base de soja com polpa de fruta. *Universidade de São Paulo*. São Paulo.
- Oliveira, N. M; Sivirieri K.; Alegro A. H. J.; Saad. I. M. S. (2002). Aspectos Tecnológicos de Alimentos Funcionais Contendo Probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38.
- Pimentel, C. V. de M.; Francki, V. M.; Gollücke, A. P. B. (2005) Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. *Editores Varela*, São Paulo.
- Ponchio, F.; Solizetto, J.; Oliveira, T.; Aria, V.(2017) *Aplicação de probióticos encapsulados em barra de frutas*. Instituto Mauá de tecnologia. São Caetano do Sul.
- Vizzotto, M.; Krolow, C. A.; Teixeira, C. F. (Dezembro de 2010) Alimentos Funcionais: Conceitos Básicos. A. L. Heberlê, 20.
- Watson, R. R.; Preesy, R. V. (2016). *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*. Amsterdam, Academic Press.